



# **Molekulare Epidemiologie und Populationsbiologie**

**von**

***Clostridium difficile***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Nils Henning Zaiß  
aus Saarbrücken

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor Dr. Dieter Jahn

Professor Dr. Wolfgang Witte

12.07.2010

10.09.2010

Druckjahr 2010

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

**Zaiß, N. H., Witte, W. & Nübel, U.** Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerging infectious diseases* 16: 675-677 (2010).

**Zaiß, N. H., Rupnik, M., Kuijper, E. J., Harmanus, C., Michielsens, D., Janssens, K. & Nübel, U.** Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. *BMC microbiology* 9: 6 (2009).

**Zaiß, N. H., Weile, J., Ackermann, G., Kuijper, E., Witte, W. & Nübel, U.** A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. *Euro Surveill* 12: E071115.1 (2007).

**Arvand, M., Hauri, A. M., Zaiß, N. H., Witte, W. & Bettge-Weller, G.** *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill* 14: pii: 19403 (2009).

## **Tagungsbeiträge**

**Zaiß, N. H., Fortier, L. C., Limbago, B. M., Akerlund, T., Kato, H., Kist, M., Witte, W. & Nübel, U.:** Microevolution and phylogeography of *Clostridium difficile* ribotype 027. (Vortrag) 3. Joint Conference der Jahrestagungen der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover (2010).

**Zaiß, N. H., Rupnik, M., Kuijper, E. J., Harmanus, C., Michielsen, D., Janssens, K., Witte, W. & Nübel, U.:** Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. (Poster) 6. internationale ClostPath Konferenz „Clostridia: The Impact of Genomics on Disease Control“, Rom (2009).

**Zaiß, N. H., Nübel, U & Witte, W.:** Molekulare Typisierung von *C. difficile* Isolaten. (Vortrag) 2. Regensburger Meeting für angewandte Molekulare Diagnostik (REMMDI), Regensburg (2009).

**Zaiß, N. H., Nübel, U & Witte, W.:** Molekulare Epidemiologie von *C. difficile*. (Vortrag) 9. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), Berlin (2008).

**Zaiß, N. H., Nübel, U & Witte, W.:** Molekulare Typisierung von *Clostridium difficile* – Wie viel Typisierung ist sinnvoll? (Vortrag) 1. Interdisziplinärer Workshop zu *Clostridium difficile*, Berlin (2008).

**Zaiß, N. H., Rupnik, M., Kuijper, E. J., Witte, W. & Nübel, U:** Development and application of a new sequence-based typing method for the surveillance and detection of epidemic *Clostridium difficile* strains. (Poster) 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden (2008).



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Clostridien .....	2
1.2 <i>Clostridium difficile</i> .....	3
1.3 Pathogenese und Klinik .....	4
1.4 Therapie und Prävention .....	7
1.5 Steigende Inzidenz von <i>C. difficile</i> Infektionen .....	8
1.6 Molekulare Typisierung von <i>C. difficile</i> .....	9
1.7 Epidemiestamm <i>C. difficile</i> PCR-Ribotyp 027 .....	12
1.8 Fluorchinolonresistenz .....	13
1.9 Populationsstruktur von <i>C. difficile</i> .....	14
1.10 Zielsetzung .....	15
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1 Instrumente und Materialien .....	17
2.1.1 Instrumente .....	17
2.1.2 Chemikalien und Kits .....	18
2.1.3 Medien und Puffer .....	19
2.1.4 Sterilisation .....	20
2.1.5 Software .....	21
2.2 Anzucht und Stammhaltung von <i>C. difficile</i> .....	22
2.2.1 Stämme von <i>C. difficile</i> .....	22
2.2.2 Anzucht von <i>C. difficile</i> Isolaten .....	22
2.2.3 Anzucht von <i>C. difficile</i> aus Stuhlproben .....	23
2.2.4 Identifizierung von <i>C. difficile</i> .....	23
2.2.5 Stammhaltung .....	24
2.3 Molekularbiologische Methoden .....	24
2.3.1 Extraktion chromosomaler DNA .....	24
2.3.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA .....	24
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
2.3.4 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen .....	28
2.3.5 Agarosegelelektrophorese .....	28
2.4 DNA-Sequenzierung .....	28
2.4.1 Didesoxymethode nach Sanger .....	28
2.4.2 454-Pyrosequenzierung .....	29
2.4.3 Annotation und phylogenetische Analysen .....	29
2.5 Molekulare Typisierung von <i>C. difficile</i> .....	30
2.5.1 PCR-Ribotypisierung .....	30
2.5.2 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) .....	31
2.5.3 <i>Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis</i> (MLVA) .....	33
2.5.4 Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST) .....	34
2.5.5 Diskriminatorischer Index, System Konkordanz und Analysen zur molekularen Evolution .....	36
2.6 Analytische Methoden .....	37
2.6.1 Nachweis von SNPs mittels denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC) ..	37
2.6.2 Antibiotikaresistenztestung mittels Epsilometer-Tests .....	39
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
3.1 Molekulare Epidemiologie von <i>C. difficile</i> .....	40
3.1.1 Erster Nachweis des <i>C. difficile</i> PCR-Ribotyps 027 in Deutschland .....	40
3.1.2 Erste bundesweite Daten über die <i>C. difficile</i> Ribotypverteilung in Deutschland .....	42
3.1.3 Erste bundesweite Daten zur Antibiotikaresistenz von <i>C. difficile</i> aus schweren Infektionsverläufen in Deutschland .....	44

3.2 Entwicklung eines neuen DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für <i>C. difficile</i> .....	46
3.2.1 Identifizierung geeigneter repetitiver Regionen zum Aufbau eines DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für <i>C. difficile</i> .....	47
3.2.2 Typisierbarkeit und Diskriminierungsvermögen der repetitiven Regionen TR6 und TR10 im Vergleich zur PCR-Ribotypisierung.....	48
3.2.3 Etablierung der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST).....	50
3.2.4 Konkordanz der TRST zur PCR-Ribotypisierung .....	52
3.2.5 Konkordanz der TRST zur MLST .....	54
3.2.6 Subdifferenzierung ausgewählter Isolate mit Hilfe der MLVA .....	56
3.2.7 Evolution der TRST Wiederholungssequenzen .....	57
3.3 Mikroevolution und Phylogeographie des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027.....	59
3.3.1 Genomweite Mutationsanalysen zur Aufklärung der genetischen Populationsstruktur des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027 .....	59
3.3.2 Korrelation der MLVA Cluster mit Fluorchinolonresistenz und Gengehalt.....	61
3.3.3 Hohes Homoplasielevel der MLVA .....	63
3.3.4 Populationsgeschichte und geographische Ausbreitung des Ribotyps 027.....	66
3.3.5 Vergleichende Genomanalysen des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027 .....	67
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
4.1 Molekulare Epidemiologie von <i>C. difficile</i> in Deutschland.....	74
4.1.1 Epidemische Verbreitung des Ribotyps 001 in Deutschland .....	74
4.1.2 Hohe Prävalenz der Fluorchinolonresistenz bei <i>C. difficile</i> in Deutschland.....	76
4.1.3 Ausblick zur Epidemiologie von <i>C. difficile</i> .....	78
4.2 Etablierung eines neuen, DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für <i>C. difficile</i> .....	78
4.2.1 Klonale Evolution der Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 .....	79
4.2.2 Hohe Konkordanz der TRST zur PCR-Ribotypisierung .....	81
4.2.3 Hohe Konkordanz der TRST zur Phylogenie von <i>C. difficile</i> .....	82
4.2.4 Ausblick zur molekularen Typisierung von <i>C. difficile</i> .....	85
4.3 Mikroevolution und Phylogeographie des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027.....	86
4.3.1 <i>Clostridium difficile</i> Stämme des Ribotyps 027 sind genetisch hoch konserviert .....	86
4.3.2 Ausbreitung einer neuen Linie des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027 .....	87
4.3.3 Genomanalysen betätigen die Evolution unterschiedlicher Linien des Ribotyps 027 .....	90
4.3.4 Ausblick zur Analyse der Mikroevolution des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027.....	93
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>XXII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XLIX</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>LI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>LII</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>LIII</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>LV</b>

## Zusammenfassung

*Clostridium difficile* ist der häufigste Erreger postantibiotischer Diarrhöen. Die Inzidenz von *C. difficile* Infektionen (CDI) ist in den letzten Jahren weltweit stark gestiegen, zum Teil assoziiert mit der Ausbreitung hoch virulenter Epidemiestämme des Ribotyps 027. Im August 2007 erfolgte retrospektiv der erste deutsche Nachweis des Ribotyps bei einem Patienten aus Stuttgart. Da in Deutschland keine Daten über die Ribotypverteilung und deren Antibiotikaresistenz existierten, wurden von Januar bis Dezember 2008 670 Isolate aus 84 Krankenhäusern des gesamten Bundesgebietes molekular typisiert. Ribotyp 001 war der bei weitem prävalenteste Ribotyp, verantwortlich für schwere Infektionen in 70 % der einsendenden Krankenhäuser, gefolgt von Isolaten des Ribotyps 078 (23 %) und 027 (19 %). Resistenzen gegenüber den Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin waren nicht nachweisbar, wohingegen eine weit verbreitete Fluorchinolonresistenz und konvergent entwickelte Gyrase Mutationen für eine adaptive Selektion und ein hohes CDI Risiko nach Applikation sprechen.

Eine molekulare Typisierung von *C. difficile* ist erforderlich, um die Verbreitung epidemischer Erregervarianten erfassen und einer weiteren Ausbreitung entgegenwirken zu können. Über die Analyse der DNA-Sequenzpolymorphismen von zwei repetitiven Regionen wurde ein neues Typisierverfahren (TRST – Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung) für *C. difficile* entwickelt. Evaluiert anhand einer internationalen Stammsammlung von 154 Isolaten verfügte TRST über eine hohe Konkordanz zur PCR-Ribotypisierung bei gleicher Diskriminierungsfähigkeit. Weiterhin konnte über vergleichende Analysen mit der Multilokus-Sequenz-Typisierung gezeigt werden, dass TRST in der Lage ist, die klonale Populationsstruktur und Phylogenie von *C. difficile* korrekt abzubilden. Durch die Sequenzanalyse werden dabei hoch reproduzierbar eindeutige Typen festgelegt und die Nachteile subjektiv auszuwertender Typisierverfahren überwunden. Demzufolge stellt TRST ein geeignetes Verfahren für die Typisierung von *C. difficile* dar, welches die Vergleichbarkeit internationaler epidemiologischer Studien gewährleistet.

Um die Hintergründe der weltweiten Ausbreitung des Ribotyps 027 verstehen zu können, sind fundierte Kenntnisse der genetischen Populationsstruktur des Epidemiestammes erforderlich. Über eine hochauflösende Typisierung von 60 internationalen Isolaten mit Hilfe von Mikrosatelliten (MLVA) konnte die globale Ausbreitung einer neuen Erregervariante des Ribotyps gezeigt werden. Die Genomsequenzierung eines Isolats aus Deutschland und anschließende vergleichende Analysen bestätigten die Evolution neuer Linien, wodurch zur Aufklärung der Entwicklungsgeschichte des Ribotyps 027 beigetragen werden konnte.



## 1 Einleitung

Die Epidemiologie als Wissenschaftszweig der medizinischen Mikrobiologie befasst sich mit der Verteilung und Häufigkeit von Infektionskrankheiten in einer Wirtspopulation und den Faktoren, welche die Krankheitsverläufe sowie deren Verteilung und Häufigkeit bestimmen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnten durch die Arbeiten von Robert Koch zur Reinkultur von Mikroorganismen und Keimtheorie der Krankheiten (Kochsche Postulate 1884) erstmals gezielt Krankheitserreger identifiziert werden, wodurch die Voraussetzungen für deskriptive epidemiologische Untersuchungen geschaffen wurden. So führte die Beschreibung von Krankheitsursachen und Verläufen dazu, dass neben den Erregern auch Risikogruppen erfasst und Risikofaktoren quantifizierbar wurden. Über eine Erregercharakterisierung und Typisierung (experimentelle Epidemiologie) und die Planung und Durchführung von Kontrollstudien konnte eine bessere Bewertung und Vorhersage der Auswirkungen einer Krankheit ermöglicht werden, Interventionsmaßnahmen wurden evaluierbar und über ein Frühwarnsystem Folgen teilweise kontrollierbar.

Schon Ende des 19. Jahrhunderts führten epidemiologische Beobachtungen des ungarischen Arztes Ignaz Semmelweis dazu, das oftmals tödliche Kindbettfieber durch Einführung konsequenter Hygienemaßnahmen einzudämmen. Als Folge dessen entwickelte der britische Chirurg Joseph Lister basierend auf Arbeiten von Louis Pasteur seine Prinzipien zur Keimfreiheit in der Chirurgie (1867), wodurch die gezielte Anwendung antiseptischer Mittel und damit die Desinfektion Einzug in die Medizin hielt. Damit hat die Epidemiologie durch die Aufklärung von Krankheitsursachen und abgeleiteter Präventionsmaßnahmen maßgeblich zur Hebung der Lebenserwartung und damit Lebensqualität der Bevölkerung beigetragen.

Die im 21. Jahrhundert durch den Fortschritt in der Molekularbiologie und Informationstechnik verbesserte Methodik führte zu einem erweiterten Verständnis epidemiologischer und phylogenetischer Zusammenhänge der Erregerausbreitung. So können heute durch molekulare Typisierungsverfahren bei vielen Erregern Ausbrüche und Infektketten besser erfasst und damit schneller unterbrochen werden - oftmals unterstützt durch Internet-basierte Datenbanksysteme, die eine international durchgeführte Surveillance (epidemiologische Überwachung) erleichtern. Über vergleichende Genom- und Mutationsanalysen ist es möglich, phylogenetische Zusammenhänge und zugrundeliegende evolutionäre Prozesse bei der Ausbreitung bestimmter Erregervarianten aufzuklären, wodurch Rückschlüsse auf zukünftige Entwicklungen gezogen werden können. Bei vielen Erregern sind solche Verfahren aber nicht etabliert und

die Hintergründe der Erregerausbreitung völlig unbekannt. Dies hat dazu beigetragen, dass durch fehlende oder falsche Maßnahmen zur Infektionskontrolle in vielen Ländern eine Zunahme nosokomialer Infektionen mit teilweise hoch adaptierten Hospitalerregern zu verzeichnen ist.

So stehen dem Fortschritt in der Medizin, der insbesondere auf dem Gebiet der invasiven Medizin zu einem erhöhten Infektionsrisiko und damit verstärkten Antibiotikaeinsatz geführt hat, neue Probleme wie das vermehrte Auftreten multiresistenter Hospitalstämme entgegen, die einer immer älter werdenden, immungeschwächten Patientendemographie begegnen. Ende der 70er Jahre wurde erstmals über eine Zunahme schwer verlaufender postantibiotischer Kolitiden nach Clindamycin-Applikation berichtet, 1978 erfolgte die Zuordnung der Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen zum Erreger *Clostridium difficile* (Bartlett *et al.*, 1977; George *et al.*, 1978). Die Inzidenz von *C. difficile* Infektionen ist in den letzten Jahren weltweit gestiegen und *C. difficile* hat sich zum bedeutendsten Enteropathogen nosokomialer Diarrhöen etabliert (Bartlett, 2002; Kuijper *et al.*, 2006a). Fragestellungen zur molekularen Epidemiologie und Populationsbiologie von *C. difficile* sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## 1.1 Clostridien

Die Clostridien bilden eine artenreiche Gattung innerhalb der Familie der *Clostridiaceae* und gehören dem Stamm (lateinische Bezeichnung „Phylum“) der Firmicutes an, der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (unter 50 Prozent). Die Gattung enthält obligat anaerobe, fermentative Arten, die ubiquitär verbreitet vornehmlich im anoxischen Milieu des Bodens und Intestinaltrakts von Säugetieren vorkommen. Clostridien besitzen die Fähigkeit zur Bildung aerotoleranter Endosporen, welche eine Toleranz gegen Wärme und Austrocknung sowie gegen eine Reihe chemischer Substanzen, einschließlich vieler Desinfektionsmittel verleihen.

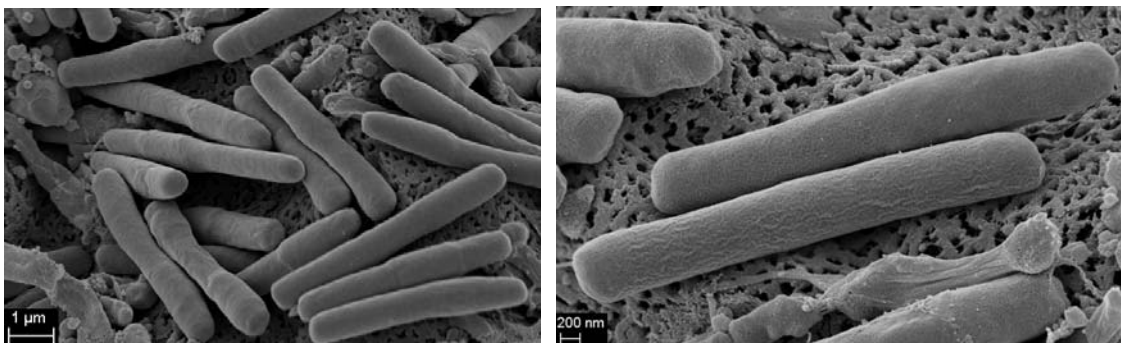
Aufgrund eines fehlenden Cytochromsystems und der fast ausschließlichen ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung zeichnet sich die Gattung durch eine Vielfalt an Gärungsreaktionen aus. Anhand des Gärstoffwechsels und der fermentierten Substrate lassen sich die Clostridien in die Gruppen der saccharolytischen Clostridien (vergären Kohlenhydrate), proteolytische Clostridien (vergären Aminosäuren), Purin-, Harnsäure- und Ethanol-Verwerter unterteilen. Mit der Ausnahme von *Clostridium perfringens* sind alle (pathogenen) Clostridien peritrich begeißelt und damit motil.

Durch die Fähigkeit zur Synthese von speziesspezifischen Exotoxinen beinhaltet die Gattung bedeutende human- und tierpathogene Arten wie *C. botulinum*, Verursacher meist letal verlaufender Lebensmittelintoxikationen (Botulismus), *C. tetani*, dem Erreger des Wundstarrkrampfes (Tetanus), den Gasbrand-Erregern *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, und *C. sordellii*, und den Erreger postantibiotischer Diarrhöen und der Pseudomembranösen Kolitis (PMC), *C. difficile*.

## 1.2 *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* konnte erstmals bei Untersuchungen zur Zusammensetzung der Normalflora gesunder Neugeborener 1935 durch Hall und O'Tool identifiziert und beschrieben werden (Hall & O'Tool, 1935). Aufgrund der unter damaligen Bedingungen schwierigen anaeroben Isolation und Kultivierung wurde der Artnamen *difficile* (lateinisches Wort für „schwierig“) vergeben.

*C. difficile* ist ein Gram-positives, schlankes Stäbchenbakterium, dessen Größe zwischen 3-16,9 x 0,5-1,9 µm variieren kann und zur subterminal gelegenen Endosporenbildung befähigt ist (Abb. 1.1). Das Bakterium ist in der Lage Monosaccharide wie Fruktose, Mannose, Glukose, Mannitol und Xylose zu fermentieren und wird bezüglich der Substratverwertung in die Gruppe der saccharolytischen Clostridien eingeordnet (Hatheway, 1990). Weiterhin charakteristisch ist die Bildung von para-Kresol aus Norleucin und Tyrosin, dessen bakteriostatische Wirkung diskutiert und ausgeprägter Geruch nach „Pferdestall“ zur Diagnostik verwendet wird (Dawson *et al.*, 2009; Jones, 1989).



**Abb. 1.1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *C. difficile*. (Foto: G. Holland und N. Bannert, Robert Koch-Institut).

*C. difficile* kommt ubiquitär verbreitet vor und konnte neben dem Intestinaltrakt von Tier und Mensch selektiv aus Umweltproben (z.B. Erdboden, Heu, Oberflächenwasser) und auch Le-

bensmitteln (Fleisch, Gemüse) isoliert werden (Brazier, 1998; Songer *et al.*, 2009). Beim Menschen gelingt der Nachweis häufig im Darm gesunder Säuglinge und Kleinkinder (bis zu 80 %) aber vergleichsweise selten im Darm asymptomatischer Erwachsener (5 %), was auf Änderungen der Mukosamembran und deren Mikroflora zurückgeführt wird (Brazier & Borriello, 2000; Larson *et al.*, 1982). Nach stationärer Aufnahme kommt es durch eine erhöhte Prävalenz von *C. difficile* in Krankenhäusern und der damit verbundenen Sporenkontamination der Krankenhausumgebung zu einer schnellen Akquisition des Erregers und zu einem Anstieg der Besiedlung auf ca. 20-40 % (Bartlett, 2006).

### 1.3 Pathogenese und Klinik

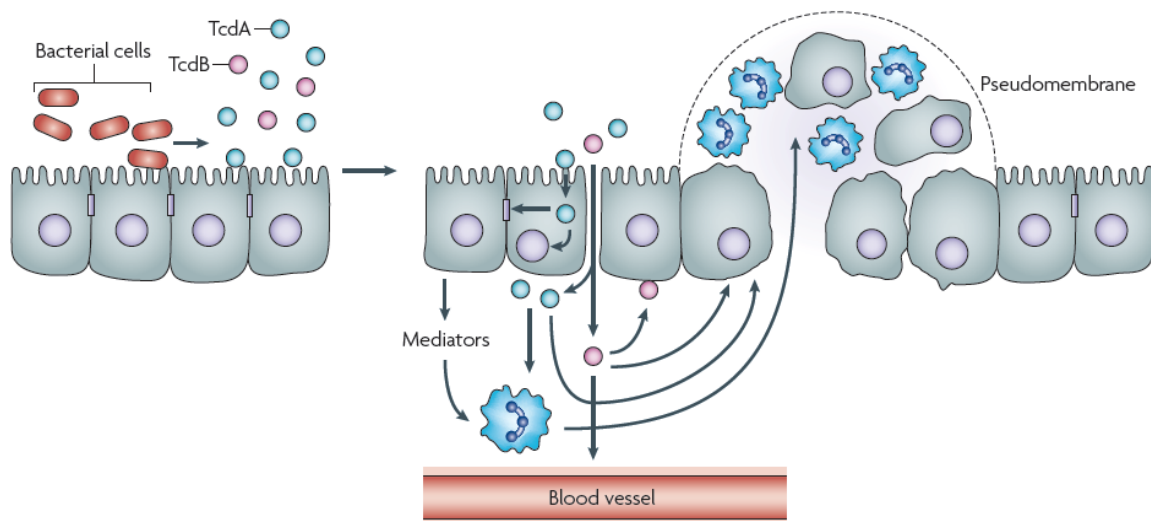
Obwohl die Injektion gefilterter Kulturüberstände im Tierversuch schon 1935 eine Toxinsekretion und mögliche pathogene Rolle von *C. difficile* vermuten lies (Hall & O'Tool, 1935), wurde *C. difficile* als Humanpathogen erst Ende der 1970er im Zusammenhang mit Antibiotikabehandlung identifiziert (Bartlett *et al.*, 1978; George *et al.*, 1978; Larson *et al.*, 1978).

Als krankheitsauslösend gelten disponierende Faktoren auf Seiten des Wirtes wie der Zustand der physiologischen Darmflora und der Immunstatus eines Patienten sowie spezifische Erreger Eigenschaften (Tab. 1.1). Eine intakte physiologische Darmflora bietet einen ausreichenden Kolonisationsschutz gegenüber *C. difficile*. Kommt es durch eine Antibiose oder Chemotherapie zur Störung der Darmphysiologie (Dysbiose) sind resistente oder in der Krankenhausumgebung neu akquirierte *C. difficile* Stämme in der Lage, die frei gewordenen anaeroben Nischen im Kolon zu besetzen (Baines *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008; Merrigan *et al.*, 2003). Während in den Siebziger und Achtziger Jahren vor allem das gegen anaerobe Infektionen eingesetzte Breitspektrum-Antibiotikum Clindamycin als Risikofaktor für eine *C. difficile* Infektion (CDI) galt, weiß man heute, dass faktisch alle Antibiotika eine CDI auslösen können. Als besonders Risiko behaftet gilt aber weiterhin die Exposition gegenüber Breitpektrum-Antibiotika mit guter Abdeckung gegen Anaerobier wie Cephalosporinen der 2. und 3. Generation, Clindamycin und Fluorchinolonen der 3. und 4. Generation (Monaghan *et al.*, 2008).

*C. difficile* Infektionen sind vorwiegend Toxin vermittelte, intestinale Erkrankungen und eine extraintestinale Manifestation ist selten. Als Hauptpathogenitätsfaktoren wurden zwei Exotoxine identifiziert, Toxin A (TcdA, 308 kDa) und Toxin B (TcdB, 270 kDa) (Taylor *et al.*, 1981). Beide Toxine befinden sich gemeinsam kodiert mit einem alternativen Sigmafaktor TcdR, der in die positive transkriptionale Regulation involviert ist, einem wahrscheinlichen

Antisigmafaktor und damit negativen Regulator TcdC und einem dem Holin der Bakteriophagen ähnlichen Protein TcdE auf einem klar definierten genetischen Element, dem Pathogenitätslocus (PaLoc). *C. difficile* Stämme mit deletiertem Pathogenitätslocus gelten als avirulent (Lyras *et al.*, 2009; Rupnik *et al.*, 2009).

TcdA und TcdB sind genetisch nah verwandt und modifizieren spezifisch die kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rho, Rac und Cdc42). Über die Monoglykosylierung eines spezifischen Threonin-Restes (Threonin-37 in Rho, Threonin-35 in Rac und Cdc42 Proteinen), der in die Bindung des Guaninnukleotids involviert ist, werden die kleinen GTPasen in der inaktiven Konformation gehalten und können ihre Schalterfunktion in den Kaskaden nicht mehr ausüben (Voth & Ballard, 2005). Da Rho-GTPasen bedeutend bei der Regulation dynamischer Gestaltungsprozesse des Aktinzytoskeletts sind, verlieren intestinale Zellen ihre strukturelle Integrität, es kommt zur Desintegration von Tight-Junctions und Auflösung mitochondrialer Membranen, wodurch Epithelzellen in Apoptose überführt werden. Durch die Zerstörung der Zellen verliert das Darmepithel seine Schrankenfunktion wodurch sich eine Diarrhöe manifestiert. Des Weiteren sind die Toxine in der Lage direkt die Expression inflammatorischer Mediatoren zu induzieren und über die Rekrutierung von Entzündungszellen wie Makrophagen, Mastzellen und Neutrophiler Granulozyten schwere Entzündungssymptome auszulösen (Voth & Ballard, 2005) (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Pathogenese von *C. difficile*.** Nach Zerstörung der Kolonisationsresistenz durch eine Antibiose ist *C. difficile* in der Lage den Darm zu besiedeln (Adhäsine). Pathogene Stämme produzieren als Hauptvirulenzfaktoren zwei Exotoxine, TcdA und TcdB. Beide Toxine wirken zytotoxisch nach Rezeptor-vermittelter Endozytose durch die Inhibition kleiner GTPasen der Rho-Familie. Darüber hinaus induzieren die Toxine direkt die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wodurch es zur Akkumulation Neutrophiler Granulozyten und der Bildung von Pseudomembranen durch schwere Entzündungsreaktionen kommen kann. Abbildung entnommen aus Rupnik *et al.*, 2009.

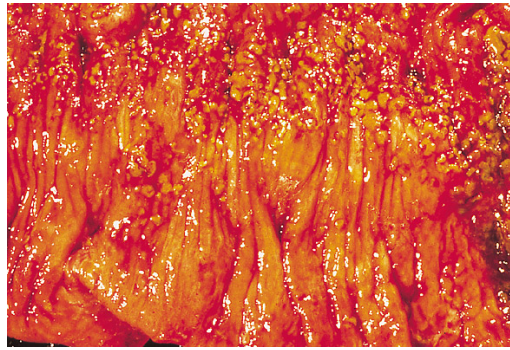
Darüber hinaus konnte in einigen Stämmen die Expression eines dritten Toxins, dem sogenannten „binären Toxins“ CDT, einer Aktin-spezifischen ADP-Ribosyltransferase mit Homologien zum Iota Toxin von *C. perfringens*, nachgewiesen werden, dessen Zytotoxizität in Zellkulturexperimenten gezeigt aber Funktion in der Pathogenese von *C. difficile* noch nicht verstanden ist (O'Connor *et al.*, 2009; Popoff *et al.*, 1988).

**Tab. 1.1: Zusammenstellung bisher identifizierter Virulenzfaktoren von *C. difficile***

Pathogenitätsfaktor	Wirkung	Funktion in der Pathogenese
Toxin A (TcdA)	Glykosyltransferase - Inhibition kleiner GTPasen der Rho-Familie, Apoptose von Enterozyten	Zerstörung der Darmmukosa
Toxin B (TcdB)	Glykosyltransferase - Inhibition kleiner GTPasen der Rho-Familie, Apoptose von Enterozyten	Zerstörung der Darmmukosa
Binäre Toxin (CDT)	Aktin-spezifischen ADP-Ribosyltransferase	unbekannte Funktion
Cwp84	Cysteinprotease, Abbau der extrazellulären Matrix	Kolonisation des Darms
Cwp66	Zellwandprotein, Adhäsion	Kolonisation des Darms
SlpA	<i>surface layer</i> Protein A, Adhäsion	Kolonisation des Darms
Fbp68	Fibronektin-Bindeprotein, Adhäsion	Kolonisation des Darms
FliC, FliD	Flagellum - Motilität von <i>C. difficile</i>	Kolonisation des Darms

Ob und in welchem Ausmaß sich eine Krankheits symptomatik manifestiert ist neben der Toxizität des Erregers abhängig vom Immunstatus des Patienten (Kyne *et al.*, 2000). Die Symptome einer CDI reichen von asymptomatischer Besiedlung bei ausreichend spezifischer Immunabwehr oder apathogener Besiedlung, über selbstlimitierende Diarrhöen bis hin zur Pseudomembranösen oder fulminanten Kolitis mit Komplikationen wie Ileus, toxisches Megakolon und Kolonperforation (Abb. 1.3).

Die Letalität einer CDI wird durchschnittlich mit 6 % angegeben, kann aber bei älteren Patienten mit Komorbiditäten oder einer schweren Manifestation der CDI deutlich höher liegen (Karas *et al.*, 2010). Weitere Risikofaktoren einer Symptomatik stellen neben der Antibiose und Immunsuppression ein hohes Alter > 60 Jahren, gastrointestinale Grundkrankheiten, ein langer Krankenhausaufenthalt sowie abdominal chirurgische Interventionen dar (Elliott *et al.*, 2007).



**Abb. 1.3: Histopathologischer Befund einer Pseudomembranösen Kolitis (PMC).** Charakteristisch für eine PMC ist das Auftreten von Pseudomembranen (gelben Plaques) auf der Mukosa, strukturlose Auflagerungen aus Fibrin und Exsudaten als Folge schwerer Entzündungsreaktionen. Abbildung entnommen aus Mylonakis *et al.*, 2001.

## 1.4 Therapie und Prävention

Bei 15-23 % der Patienten führt bereits das Absetzen oder die Umstellung der zur Infektion führenden Antibiose bei gleichzeitiger symptomatischer Therapie durch Flüssigkeits- und Elektrolytzufuhr zum Sistieren der Diarrhöe in 2-3 Tagen. Ist aus medizinischer Sicht die Beendigung der Therapie nicht vertretbar, sind eine fehlende Besserung oder schwere Symptome zu beobachten oder handelt es sich um ältere oder immunsupprimierten Patienten, ist eine medikamentöse Therapie indiziert. Für die antimikrobielle Therapie werden derzeit oral verabreichtes Metronidazol und Vancomycin empfohlen, im Fall eines lebensbedrohlichen Krankheitsverlaufs eine Kombinationstherapie beider Antibiotika. Resistenzen sind bisher nicht bekannt, aber eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol wurde im Zusammenhang mit Epidemiestämmen berichtet (Baines *et al.*, 2008; Brazier *et al.*, 2008). Ein weiteres Problem stellen durch die Therapieantibiose bedingte rekurrende Infektionen bei bis zu 40 % der behandelten Patienten dar (Johnson, 2009).

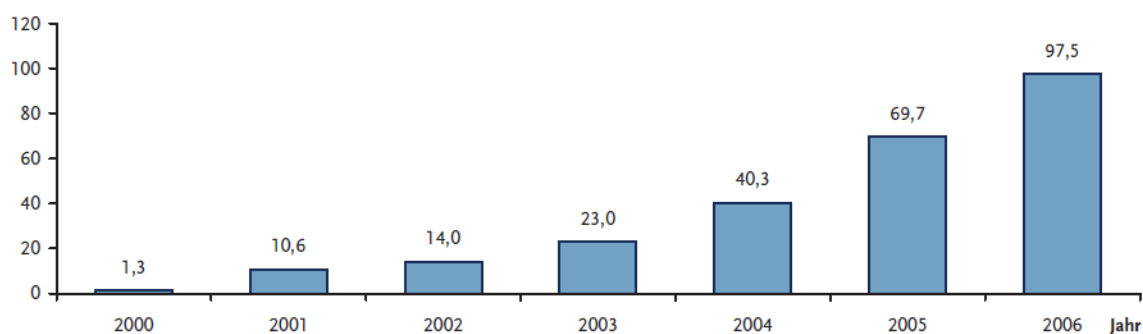
Aufgrund bisher fehlender, ausreichend evaluierter Therapiealternativen ist vor allem der Prävention eine wichtige Rolle zuzuschreiben, um durch eine intensivierete Infektionskontrolle und zügige Umsetzung von Hygienemaßnahmen die Inzidenz der CDI senken zu können (Rupnik *et al.*, 2009; Vonberg *et al.*, 2008). Dadurch dass infizierte Patienten große Mengen an Sporen und vegetativen Zellen ausscheiden ist besonders die frühzeitige Erkennung der Infektion beim Indexpatienten auf Basis einer etablierten Surveillance entscheidend, um über eingeleitete Isolationsmaßnahmen bei strikter Kittel- und Handschuhpflege des Krankenhauspersonals eine weitere Transmission unterbinden zu können. Aufgrund der Resistenz der Sporen gegenüber Desinfektionsmitteln auf Alkoholbasis sollten für die tägliche Wischdesinfek-

tion Oxidantien (Peressigsäure, Natriumhypochlorit) verwendet und zusätzlich zur Händedesinfektion die Händewaschung mit Seife zur Entfernung der Sporen vorgenommen werden. Weiterhin kann ein restriktiver Antibiotika-Einsatz unter besonderer Berücksichtigung der zur CDI beitragen Substanzklassen ebenfalls dazu beitragen, die Häufigkeit nosokomialer *C. difficile* Infektionen signifikant zu senken (Davey *et al.*, 2006; Pear *et al.*, 1994; Valiquette *et al.*, 2007).

### 1.5 Steigende Inzidenz von *C. difficile* Infektionen

*C. difficile* ist für insgesamt 15-20 % der Antibiotika-assoziierten Durchfallerkrankungen und mehr als 95 % der Fälle von Pseudomembranöser Kolitis verantwortlich und gehört damit zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen (Bartlett, 1979; Bartlett, 2002; Silva, 1994; Thomas *et al.*, 2003). Die Inzidenz *C. difficile*-assoziiierter Erkrankungen ist in den letzten 10 Jahren weltweit stark gestiegen (Kuijper *et al.*, 2006a; Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2006; Zilberberg *et al.*, 2008). In den USA konnte eine Verdopplung der Krankenhauseinweisungen aufgrund einer CDI von 5,5 Fällen pro 10.000 Einwohnern auf 11,2 Fälle in den Jahren 2000 bis 2005 verzeichnet werden (Zilberberg *et al.*, 2008). In England wurde ein Anstieg der gemeldeten *C. difficile* Infektionen von 20.000 im Jahr 2000 auf über 55.000 im Jahr 2006 beobachtet mit über 3000 Todesfällen jährlich (Brazier, 2008; Carter, 2009). Auch in Deutschland ergab eine Analyse der Entlassungsdiagnosen der Jahre 2000 bis 2004 einen Anstieg der CDI von 1,3 auf 40,3 Fälle pro 100.000 stationär behandelter Patienten; gegenüber 2004 hat sich die Inzidenz 2006 dann noch einmal auf 97,5 mehr als verdoppelt (Vonberg *et al.*, 2007; Vonberg & Gastmeier, 2008) (Abb. 1.4).

Anzahl Enterokolitis durch *C. difficile* pro 100.000 Entlassungen



**Abb. 1.4:** Anzahl der Erkrankungen an Enterokolitis durch *C. difficile* (ICD-10-Diagnose A04.7) bei vollstationären Patienten in Deutschland nach Jahr. Daten des Statistischen Bundesamtes 2000–2006. Abbildung entnommen aus Vonberg & Gastmeier, 2008.



Inwieweit diese Entwicklung auf einen tatsächlichen Anstieg der Erkrankungen zurückzuführen oder durch eine Zunahme an Untersuchungsanforderungen und/oder eine verbesserte Diagnostik bedingt ist, kann bisher nicht sicher beurteilt werden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass dieser drastische Anstieg weltweit alleine durch Änderungen im Meldeverhalten der Ärzte begründet liegt. Da vor allem ältere immunsupprimierte Patienten betroffen sind, ist aufgrund der demographischen Entwicklung in Deutschland mit einer weiteren Zunahme der CDI-Inzidenz zu rechnen. Außerdem ist bisher nicht geklärt, inwieweit das Auftreten besonders virulenter Stämme ebenfalls zu einem Inzidenzanstieg beigetragen kann.

## 1.6 Molekulare Typisierung von *C. difficile*

Die Identifizierung epidemiologisch relevanter Stämme setzt die molekulare Typisierung des Erregers voraus. Anhand ausgewählter phänotypischer oder genotypischer Merkmale kann der Erreger in bestimmte Stämme diskriminiert werden. Ein Typisierungsergebnis sollte dabei nie alleine stehen, sondern immer im Kontext aller verfügbaren epidemiologischen, klinischen und demographischen Daten interpretiert werden. So kann die Diversität des untersuchten Merkmals mit klinisch relevanten Phänotypen (z.B. Antibiotikaresistenz) oder Genotypen (z.B. Deletion im Toxinrepressor) korreliert und auf diese Weise Stämme identifiziert werden, die über eine besonders ausgeprägte Virulenz und/oder Ausbreitungsfähigkeit verfügen. Über das Verfolgen des Auftretens und der Verbreitung dieser Erregerstämme ist es möglich, die epidemische Ausbreitung zu erfassen, sei es zur Detektion und Aufklärung lokaler Ausbrüche, zur Verifizierung von Transmissionsketten oder zur Erkennung überregionaler Epidemien. Auf diese Weise können Interventionsstrategien abgeleitet und ein Frühwarnsystem etabliert werden, um im Rahmen einer Erregersurveillance Ausbrüche und Epidemien frühzeitig zu erkennen.

Ein geeignetes Typisierverfahren sollte neben der universellen Typisierbarkeit des Erregers und Konkordanz zur Epidemiologie eine hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der in verschiedenen Laboren erzeugten Daten gewährleisten. Darüber hinaus ist es aus populationsbiologischer Sicht sinnvoll, wenn die Diskriminierung auch den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen des Erregers entspricht. Das Typisierverfahren mit dem gegenwärtig höchsten Diskriminierungsvermögen für *C. difficile* ist die *Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) (Killgore *et al.*, 2008; Marsh *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2007). Die MLVA beruht auf der Analyse der Längenpolymorphismen von sieben über dem Genom verteilten, fast ausschließlich intergenetisch vorliegenden Wiederholungssequenzen.

Die Wiederholungsmotive sind hoch konserviert und sehr klein ( $< 10$  bp) und evolvieren vergleichsweise schnell durch intramolekulare Rekombination. Aufgrund der hohen Diskriminierungsfähigkeit ist die MLVA in der Lage, Cluster und Infektketten von *C. difficile* innerhalb eines Krankenhauses und zwischen verschiedenen Einrichtungen aufzuklären (Drudy *et al.*, 2008; Fawley *et al.*, 2008; Marsh *et al.*, 2006). Allerdings besitzt die MLVA durch die schnelle Evolution der Wiederholungsequenzen eine so hohe Variabilität, dass Verwandtschaftsverhältnisse über größere Zeiträume verdeckt werden (Killgore *et al.*, 2008). Daher setzt die MLVA die Vorcharakterisierung mit stärker konservierten genetischen Markern voraus (Fawley *et al.*, 2008; Killgore *et al.*, 2008; Marsh *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2007).

Gegenwärtig zur primären Typisierung von *C. difficile* eingesetzte Verfahren sind die *Sma*I-Makrorestriktionsmuster Analyse chromosomaler DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese, welche vor allem in Nordamerika Anwendung findet (Gal *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2005) und die PCR-Ribotypisierung in Europa (Bidet *et al.*, 1999; Stubbs *et al.*, 1999). Die PCR-Ribotypisierung erfasst den Längenpolymorphismus der ITS-Region (engl. *internal transcribed spacer*) zwischen 16S- und 23 S-rDNA. *C. difficile* besitzt wie die meisten Prokaryonten mehrere Kopien (7-15) des rRNA-Operons, deren ITS-Regionen unterschiedliche Längen aufweisen können. Entsprechend erhält man nach einer PCR, wobei die Oligonukleotid-Primer in den hoch konservierten rRNA-Genen ansetzen, und anschließender Gelelektrophorese Bandenmuster, denen spezifische Ribotypen zugewiesen werden können (Bidet *et al.*, 1999). Die nachgewiesenen Fragmente entsprechen dabei nicht nur der Reassoziation von Einzelsträngen der jeweiligen ITS-Region, sondern aufgrund von Sequenzhomologien können sich auch Einzelstränge verschiedener Regionen zusammenlagern (Heteroduplices). Bisher wurden  $> 300$  unterschiedliche Muster und damit PCR-Ribotypen für *C. difficile* vom Anaerobier Referenzlabor in Cardiff, Wales beschrieben (Kuijper *et al.*, 2009; Stubbs *et al.*, 1999).

Beide Methoden, die DNA-Makrorestriktion und PCR-Ribotypisierung, besitzen eine hohe Konkordanz in den Typisierungsergebnissen (Bidet *et al.*, 2000; Killgore *et al.*, 2008). Während die DNA-Makrorestriktion über ein etwas höheres Diskriminierungsvermögen verfügt, ist die Durchführung wesentlich arbeitsaufwändiger und zeitintensiv. Ein großer Nachteil beider Verfahren ist, dass die Typzuweisung auf der Auswertung gelelektrophoretischer Bandenmuster beruht, Muster, die aufgrund unterschiedlicher Laborbedingungen erheblich variieren können. Dementsprechend besteht nur eine begrenzte serielle Reproduzierbarkeit der Muster, die Daten sind nicht portabel und können nur schwer zwischen verschiedenen Institutionen verglichen werden. Die Standardisierung erfordert den Austausch von Referenzstämmen der je-

weiligen Ribotypen, wodurch epidemiologische Untersuchungen insbesondere im internationalen Maßstab stark behindert werden.

Typisierverfahren, die auf der Auswertung von DNA-Sequenzdaten basieren, überwinden diese Nachteile, da Sequenzdaten einfach in Datenbanken hinterlegt und ausgetauscht werden können und so epidemiologische Studien und Surveillance-Programme erheblich erleichtern. DNA-Sequenzanalysen können heute relativ schnell und kostengünstig durchgeführt werden, die Ergebnisse sind hoch reproduzierbar und vergleichbar, wodurch eindeutige Typen festgelegt werden. Ein weitverbreitetes und auch für *C. difficile* etabliertes Verfahren ist die Multi-lokus-Sequenz-Typisierung (MLST) (Griffiths *et al.*, 2009; Lemee *et al.*, 2004). Die MLST analysiert die Sequenzdiversität von sieben Haushaltsgenen, die ubiquitär verbreitet in Einzelkopie vorhanden keinem positiven Selektionsdruck unterliegen. Ein Vorteil liegt dadurch neben der Vergleichbarkeit der Ergebnisse in der Durchführbarkeit phylogenetischer Analysen und die MLST wurde zur Aufklärung der Populationsstruktur zahlreicher Bakterien verwendet (Enright *et al.*, 2000; Enright *et al.*, 2002; Maiden, 2006; Turner & Feil, 2007). Bisher sind aber nur wenige *C. difficile* Isolate mit der MLST charakterisiert worden (Griffiths *et al.*, 2009; Killgore *et al.*, 2008; Lemee *et al.*, 2004; Lemee *et al.*, 2005) und die ersten vorläufigen Ergebnisse weisen auf eine weitgehend klonale Populationsstruktur hin, die nur selten durch genetische Rekombination aufgebrochen wird. Da in klonalen Bakterien die Evolution neuer Genotypen vor allem durch Mutationsereignisse bestimmt wird, welche selten in Haushaltsgenen unter funktionserhaltender, stabilisierender Selektion sind, besitzt die MLST nur ein geringes Diskriminierungsvermögen und epidemiologisch bedeutsame Stämme werden nicht von weniger relevanten unterschieden (Griffiths *et al.*, 2009; Lemee *et al.*, 2004). Des Weiteren ist die MLST durch die Analyse von sieben Genen für Routine-Anwendungen zu zeit- und damit kostenintensiv.

Genetische Regionen mit einer höheren Variabilität als Haushaltsgene würden eine höhere Diskriminierungsfähigkeit ermöglichen, wobei auch die Analyse einzelner Regionen aufgrund der klonalen Evolution eine Typisierung gemäß der Phylogenie gewährleisten dürften, da Verwandtschaftsverhältnisse nur selten durch homologe Rekombinationsereignisse verwischt werden. Typisierverfahren, die auf der DNA-Sequenzanalyse einzelner Regionen basieren, wurden für eine Reihe bedeutender Krankheitserreger etabliert, wie für *Staphylococcus aureus* (*spa* Gen), *Campylobacter jejuni* (*flaA*), *Streptococcus pyogenes* (*emm*), und *Neisseria meningitidis* (*porA*, *fetA*).

## 1.7 Epidemiestamm *C. difficile* PCR-Ribotyp 027

In 2001 verzeichnete die Universitätsklinik von Pittsburgh, USA eine Zunahme schwerer Infektionen durch *C. difficile* und retrospektiv den ersten Ausbruch aufgrund eines Epidemiestammes, der als PCR-Ribotyp 027 oder äquivalent Nordamerikanischer Pulsotyp 1 (NAP1) in der Makrorestriktionsmusteranalyse typisiert wurde (Dallal *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2005).

Die Stämme des Ribotyps 027 sind durch eine erhöhte *in vitro* Toxin A und B Expression charakterisiert, dessen Ursache in einem stark verkürzten negativen Regulator TcdC vermutet wird (Curry *et al.*, 2007; Warny *et al.*, 2005). So konnte gezeigt werden, dass das Gen des Repressors neben einer 18 bp Deletion eine zusätzliche Einzelnukleotiddeletion an Position 117 aufweist, dessen Folge eine Leseraterverschiebung und Einführung eines Stoppkodons an Position 196 ist. Diese sinnentstellende (engl. *nonsense*) Mutation führt zu einer starken Verkürzung des Repressors von 232 auf 65 Aminosäuren. Des Weiteren zeichnen sich Stämme des Ribotyps 027 durch die zusätzliche Expression des „binären Toxins“ CDT aus, dessen Rolle in der Pathogenese von *C. difficile* aber noch nicht verstanden ist (O'Connor *et al.*, 2009; Popoff *et al.*, 1988). Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass epidemische Stämme des Ribotyps 027 über eine Multiresistenz gegen eine Reihe von Breitbandantibiotika wie Fluorchinolonen, Cephalosporinen und Makroliden sowie eine erhöhte Adhärenz zu menschlichen intestinalen Epithelzellen und höhere Sporulationsraten verfügen (Akerlund *et al.*, 2008; Fawley *et al.*, 2007; Kuijper *et al.*, 2008; Rupnik *et al.*, 2009). Ein stark deletierter Toxinrepressor, die Expression des binären Toxins, sowie eine ausgeprägte Antibiotikaresistenz konnten allerdings auch bei epidemiologisch bisher unbedeutenden Stämmen seltener Ribotypen gezeigt werden.

Der bisher älteste Ribotyp 027 Stamm konnte retrospektiv 1985 bei einem Patienten in einem Pariser Krankenhaus nachgewiesen werden (Popoff *et al.*, 1988). Während bis 2001 nur sporadische Fälle aufgrund des Ribotyps 027 verzeichnet wurden, änderte sich die Epidemiologie in 2001 und Stämme des Ribotyps zeigten nun die Fähigkeit sich rasch auszubreiten und konnten für zahlreiche Ausbrüche weltweit verantwortlich gemacht werden (Kuijper *et al.*, 2006a; Kuijper *et al.*, 2008). Die ersten großen Ausbrüche sind in Nordamerika verzeichnet worden (McDonald *et al.*, 2005), der bisher schlimmste in der kanadischen Provinz Quebec im März 2003; ein multizentrischer Ausbruch in 12 Krankenhäusern mit über 1700 betroffenen Patienten, 117 starben ursächlich wegen einer CDI innerhalb von 30 Tagen nach Diagnosestellung. Während des Ausbruchs konnte der Ribotyp 027 bei über 80 % der typisierten

Isolate nachgewiesen werden (Labbe *et al.*, 2008; Loo *et al.*, 2005). In Europa erfolgte der erste Nachweis eines Ausbruchs in einem englischen Krankenhaus in Stoke Mandeville im April 2003 (O'Connor *et al.*, 2009; Smith, 2005). Wurden bis 2003 nur zwei sporadische Fälle einer CDI aufgrund des Ribotyps 027 in England berichtet, änderte sich die Inzidenz in den folgenden Jahren und der Ribotyp 027 entwickelte sich zum prävalentesten Stamm, der 2007-08 bei über 40 % der symptomatischen Patienten in englischen Krankenhäusern registriert werden konnte (Brazier *et al.*, 2007; Brazier *et al.*, 2008).

Bis einschließlich 2007 wurden Ausbrüche oder sporadische Infektionen aufgrund des Ribotyps 027 in 40 Bundesstaaten der USA, allen kanadischen Provinzen, 15 europäischen Staaten, sowie Japan nachgewiesen (Hubert *et al.*, 2007; Kuijper *et al.*, 2008; O'Connor *et al.*, 2009). Dahingegen blieb die Situation in Deutschland trotz des starken Inzidenzanstieges der CDI wegen fehlender Untersuchungen lange unklar. Darüber hinaus sind trotz des globalen Auftretens und der Verbreitung des Ribotyps 027 weder die Entstehungsgeschichte noch die Kräfte, die eine weitere Ausbreitung fördern, vollständig verstanden. Als besonders risikobehaftet für eine erhöhte Inzidenz des Ribotyps gilt aber eine Exposition gegenüber Fluorchinolonen neuerer Generationen, wobei sich die Resistenzakquisition mit der epidemischen Verbreitung des Ribotyps nach 2001 deckt und nicht in historischen Stämmen nachgewiesen werden konnte (Gaynes *et al.*, 2004; Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2005; Pepin *et al.*, 2005).

## 1.8 Fluorchinolonresistenz

Fluorchinolone sind synthetisch hergestellte Antibiotika, die - erstmals 1983 zugelassen - heute nach den  $\beta$ -Lactamen die zweithäufigsten im Krankenhaus eingesetzten Antibiotika darstellen. Aufgrund unterschiedlicher Modifikationen des Chinolingrundgerüsts besitzen Fluorchinolone ein breites Wirkungsspektrum und werden je nach Anwendungsmöglichkeit in vier Gruppen klassifiziert, wobei sich vor allem Fluorchinolone der Gruppe IV, wie Moxifloxacin, Gatifloxacin und Gemifloxacin durch eine verbesserte Aktivität gegen Gram-positive und obligat anaerobe Bakterien auszeichnen. Die antimikrobielle Zielstruktur der Fluorchinolone stellen bakterielle Typ-II-Topoisomerasen dar, die verantwortlich für die ATP-abhängige Einführung und Auflösung superspiralisierter DNA-Strukturen und damit die Topologie der chromosomalen DNA sind und eine zentrale Rolle bei zellulären Prozessen wie der Replikation, Transkription und Rekombination spielen. Typ-II-Topoisomerasen sind Heterotetramere aus je 2 Untereinheiten, wobei bisher zwei Vertreter unterschieden werden, die Topoisomera-

se II (DNA-Gyrase) aus den Untereinheiten GyrA und GyrB und die Topoisomerase IV aus den Einheiten ParC und ParE. Fluorchinolone bilden mit der Topoisomerase und der geschnittenen chromosomalen DNA einen stabilen ternären Komplex (engl. *cleavage complex*), der eine DNA-Wiederverknüpfung verhindert und durch die damit vermehrt auftretenden freien DNA-Enden eine dauerhafte SOS-Antwort induziert, die den Zelltod herbeiführt (Hawkey, 2003; Hooper, 1999; Phillips *et al.*, 1987).

Resistenzen wurden vor allem mit Punktmutationen in den fluorchinolonbindenden Bereichen der Untereinheiten der Topoisomerasen (QRDR - engl. *quinolone resistance determining region*) assoziiert, es konnten aber auch Effluxbedingte oder Plasmidvermittelte Resistenzen im Zusammenhang mit dem Transfer von Qnr Schutzproteinen beschrieben werden (Hawkey, 2003; Hooper, 1999).

In *C. difficile* wurden Resistenzen bisher ausschließlich auf Mutationen in den Untereinheiten der DNA-Gyrase (GyrA und GyrB) zurückgeführt, da wie bei *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* und *Treponema pallidum* weder homologe Gene zur Topoisomerase IV identifiziert werden konnten noch der Einsatz von Effluxpumpen Inhibitoren wie Reserpin eine Wirkung auf die Fluorchinonempfindlichkeit zeigte (Ackermann *et al.*, 2001; Ackermann *et al.*, 2003; Dridi *et al.*, 2002; Spigaglia *et al.*, 2008). Während Resistenz-vermittelnde Plasmide bei *C. difficile* bisher noch nicht nachgewiesen wurden, konnten homologe Sequenzen zu den Pentapeptiden der Qnr-Familie im Genom von *C. difficile* identifiziert werden (Johnson *et al.*, 1999; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008). Eine heterologe Expression dieser Proteine in *Escherichia coli* zeigte allerdings keinen Effekt auf die Fluorchinolonempfindlichkeit.

## 1.9 Populationsstruktur von *C. difficile*

Fitnessvorteile für die epidemische Verbreitung einzelner Erregervarianten können genauso wie epidemiologische Zusammenhänge im Rahmen der Erregertypisierung erst richtig erkannt werden, wenn Kenntnisse über die Populationsstruktur und Phylogenie des Erregers vorhanden sind. Nur wenn die Frequenz und Verteilung eines untersuchten Merkmals in der Population bekannt sind und man darüber hinaus die der Phylogenie zugrundeliegenden evolutionären Prozesse wie das Ausmaß an Mutationen und Rekombination, Selektions- sowie demographische Prozesse (Expansion, Extinktion, Isolation einer Population) kennt, können Rückschlüsse auf die Verbreitung bestimmter Erregervarianten gezogen werden.

Da *C. difficile* als Humanpathogen erst Ende der 70er Jahre identifiziert und dem Erreger vorher kaum Beachtung geschenkt wurde, ist die Evolution und Populationsbiologie von *C. difficile* erst wenig erforscht. Erste Analysen zur Populationsgenetik mit Hilfe der MLST lassen eine klonale Populationsstruktur vermuten, in der genetische Diversität vor allem durch Punktmutationen und selten durch Rekombination entsteht (Lemee *et al.*, 2004). Die ersten vollständig sequenzierten Genome von *C. difficile* zeigten neben eines äußerst konservierten Kerngenoms außerdem einen hohen Anteil mobiler Elemente, die horizontal für die Verbreitung von Virulenzeigenschaften sorgen können (He *et al.*, 2010; Sebaihia *et al.*, 2006; Stabler *et al.*, 2009). Um den Wandel der Population im Laufe der Zeit verstehen und die Entstehungsgeschichte und Verbreitung einzelner Genotypen aufschlüsseln zu können sind weiterführende Analysen basierend auf großen, repräsentativen Stichproben einer Bakterienpopulation notwendig (Nübel *et al.*, 2008; Nübel *et al.*, 2010).

Aufgrund fehlender Studien und der mangelnden Vergleichbarkeit aktuell etablierter Typisierverfahren ist außerdem bisher nur wenig über die geographische Ausbreitung und Häufigkeit der verschiedenen Genotypen von *C. difficile* bekannt. So ist nicht geklärt, in wieweit Stämme des Ribotyps 027 bereits vor den ersten detektierten Ausbrüchen 2001 verbreitet waren und ob die derzeit in einigen Ländern beobachteten Epidemien die klonale Ausbreitung eines erfolgreichen Stammes oder konvergente Anpassung verschiedener Stämme des Ribotyps 027 repräsentieren.

## 1.10 Zielsetzung

*Clostridium difficile* ist für 20 % aller postantibiotischen Enterokolitiden verantwortlich und damit der am häufigsten nachgewiesene Enteropathogen nosokomialer Diarrhöen (Bartlett, 1979; Bartlett, 2002; Silva, 1994; Thomas *et al.*, 2003). Trotz der stetig steigenden Inzidenz *C. difficile*-assoziierter Durchfallerkrankungen in Deutschland existieren bisher keine bundesweiten Daten zu Vorkommen und Prävalenz bestimmter Genotypen in deutschen Krankenhäusern, weshalb eine mögliche Assoziation mit der Ausbreitung stärker virulenter Epidemiestämme des Ribotyps 027 nicht möglich ist. Des Weiteren ist unklar, inwiefern die Resistenz von *C. difficile* gegenüber Antibiotika neben der erhöhten Inzidenz Antibiotika-induzierter Kolitiden mitverantwortlich ist für die selektierte Verbreitung resistenter Epidemiestämme und damit maßgeblich zu einer veränderten Epidemiologie des Erregers beiträgt. Epidemiologische Untersuchungen werden dabei durch nicht standardisierbare und damit schwer vergleichbare Typisierverfahren behindert und die genetische Populationsstruktur von

*C. difficile* ist weitgehend unklar. Ohne das Verständnis der Populationsstruktur fehlt ein nötiges Bezugssystem, gegen welches genetische Unterschiede oder bestimmte Erregerphänotypen korreliert und Rückschlüsse über die Gründe der epidemiologischen Verbreitung gezogen werden könnten.

Fragestellungen zur molekularen Epidemiologie von *C. difficile* in Deutschland und Populationsbiologie des Ribotyps 027 sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Konkret wurden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

- Etablierung gängiger Typisierverfahren wie der PCR-Ribotypisierung, MLVA und MLST für *C. difficile*. Untersuchungen zur Diversität von *C. difficile* aus schweren Infektionsverläufen in Deutschland 2008. Ist ein Nachweis des *C. difficile* Ribotyps 027 in Deutschland möglich?
- Situation der Empfindlichkeit von *C. difficile* gegenüber den Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin sowie den Fluorchinolonen Levofloxacin und Moxifloxacin. Charakterisierung der Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen. Besitzen epidemische Stämme in Deutschland eine geringere Empfindlichkeit gegenüber den Therapieantibiotika? Welche Rolle spielen Fluorchinolone neuerer Generationen in der Ausbreitung des Ribotyps 027?
- Entwicklung eines DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile*. Inwiefern existiert eine Konkordanz zu etablierten Verfahren und zur Phylogenie des Erregers?
- Aufklärung der genetischen Populationsstruktur des Ribotyps 027 anhand genomweiter Einzelnukleotidpolymorphismen und der MLVA. Welche Rückschlüsse sind auf die evolutionäre Geschichte der Ausbreitung möglich?
- Sequenzierung des Genoms eines 1990 in Hamburg asservierten Ribotyp 027 Isolats. Inwieweit ermöglicht der Vergleich mit bereits publizierten Genomsequenzen Rückschlüsse auf die globale Verbreitung einer neuen Erregervariante?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Instrumente und Materialien

#### 2.1.1 Instrumente

In Tabelle 2.1 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Instrumente unter Angabe des Modells und des Herstellers aufgeführt.

**Tab. 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Instrumente mit Hersteller**

Instrument	Modell	Hersteller
<i>Agarosegelelektrophorese</i>		
Dokumentationssystem	GelDoc XR	BioRad, München
Elektrophoresekammern	Sub-Cell GT	BioRad, München
	Compact M	Biometra, Göttingen
Anaerobiertopf	AnaeroJar 2.5 l	Oxoid, Wesel
Autoklav	Varioklav® 500	Biomedis, Gießen
Brutschrank	HeraCool 40	Heraeus, Hanau
<i>dHPLC</i>		
dHPLC-System	WAVE™ System	Transgenomic, Omaha, USA
Säule	DNASep® HT	Transgenomic, Omaha, USA
<i>DNA Sequenzierer</i>		
Kapillarsequenzierer	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Pyrosequenzierer	454 GS FLX	Roche, Mannheim
Eismaschine	ZBE 70	Ziegra, Isernhagen
pH-Meter	CG840	Schott, Hofheim
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	SG-Clear UV+	SG, Barsbüttel
Spektrophotometer	SmartSpec™ 3000	BioRad, München
Sterilwerkbank	HeraSafe HS12	Heraeus, Hanau
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
	T-Professional Basic	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	MS1 Minishaker	Roth, Karlsruhe
Waagen	R180D-D1	Sartorius, Göttingen
	LP620S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL1086	Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
	Micro Centrifuge	Roth, Karlsruhe

### 2.1.2 Chemikalien und Kits

Tabelle 2.2 zeigt alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien unter Angabe des Herstellers.

**Tab. 2.2: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Kits mit Hersteller**

Substanz	Hersteller
<i>Enzyme</i>	
Hot Taq-DNA-Polymerase	PeqLab, Erlangen
Lysozym	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Optimase®-DNA-Polymerase	Transgenomic, Omaha, USA
RNase	Roche, Mannheim
<i>Kits</i>	
DNeasy® Blood & Tissue	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing	Applied Biosystems, Darmstadt
PRO Kit	Oxoid, Wesel
AnaeroGen™ 2.5 l	Oxoid, Wesel
<i>Materialien</i>	
Abgene® 96-well PCR Platten	Thermo Fischer Scientific, Passau
Clostridium-Difficile-Agar-Basis	Oxoid, Wesel
Clostridium-Difficile-Selektiv-Supplement	Oxoid, Wesel
defibrinierten Pferdeblut	Oxoid, Wesel
dNTPs	Roth, Karlsruhe
	Invitrogen, Darmstadt
E-Test Streifen	AB Biodisk, Solna, Schweden
Ethanol (96 %)	Roth, Karlsruhe
Kryobank	Mast Diagnostica, Reinfeld
Oligonukleotid-Primer	Metabion
	Invitrogen, Darmstadt
Sephadex® G-50 Fine	GE Healthcare, München
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Wattestäbchen, steril	Neolab, Heidelberg
Wolfasteril	Kesla, Greppin
<i>Molekulargewichtstandards für Agarosegele</i>	
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
100 bp DNA Ladder, extended	Roth, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Difco (Stuttgart), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

### 2.1.3 Medien und Puffer

#### Clostridium-Difficile-Agar-Basis (CDAB - Oxoid, Wesel):

<b>Zusammensetzung</b>	<b>(g/l)</b>
Proteose-Pepton	40,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,1
NaCl	2,0
Fructose	6,0
Agar	15,0
pH 7,4 ± 0,2	

#### Cycloserin-Cephoxitin-Fructose-Agar (CCFA – Oxoid, Wesel):

Zur selektiven Anzucht von *C. difficile* wurde CDAB aseptisch mit folgenden Konzentrationen von D-Cycloserin und Cephoxitin versetzt:

D-Cycloserin	250 mg/l
Cephoxitin	8 mg/l

#### Lysispuffer:

Tris-HCl	20 mM
EDTA	2 mM
Triton® X-100	1,20 %
Lyoszym	20 mg/ml
	pH 8,0

dHPLC-Puffer A:

TEAA	100 mM
	pH 7,0

dHPLC-Puffer B:

TEAA	100 mM
Acetonitril	25 %
	pH 7,0

1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA):

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM
	pH 8,3

1x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA):

Tris-HCl	40 mM
Borsäure	40 mM
EDTA	1 mM
	pH 8,3

**2.1.4 Sterilisation**

Soweit nicht anders angegeben wurden sämtliche Medien, Puffer und Glaswaren für 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser). Die sporozoiden Flächeninfektion erfolgte mit Wolfasteril<sup>®</sup> auf 0,5 %iger Peressigsäure-Basis.

## 2.1.5 Software

Tabelle 2.3 zeigt eine Zusammenstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Software.

**Tab. 2.3: Zusammenstellung der verwendeten Software mit Hersteller**

Programm	Verwendung	Hersteller
ABACAS	Ausrichtung von Kontigs anhand einer Referenz	Freeware (Assefa <i>et al.</i> , 2009)
BioNumerics v6.0	Datenbank, DNA-Sequenzanalysen, Clusteranalysen, <i>Fingerprint</i> -Analysen	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
DnaSP v4.5	Analysen zur Populationsgenetik	Freeware (Rozas & Rozas, 1999)
EpiCompare v1.0	Berechnung des Diskriminierungsvermögens, der Typisierbarkeit und der Konkordanz molekularer Typisierverfahren	Ridom, Würzburg
Kodon v3.61	Vergleichende Genomanalysen, SNP-Analysen	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
LaserGene v8.0	Assemblierung von DNA-Sequenzen	DNASTAR, Madison, USA
NavigatorTM Software	Auswertung von dHPLC-Chromatogrammen	Transgenomic, Omaha, USA
NCBI BLAST	Paarweise und multiple Sequenzvergleiche	Freeware (Altschul <i>et al.</i> , 1990)
Method Predict	Ermittlung von dHPLC Analysetemperaturen	Transgenomic, Omaha, USA
MUMmer v3.20	Vergleichende Genomanalysen, SNP-Analysen (Nucmer Algorithmus)	Freeware (Kurtz <i>et al.</i> , 2004)
Newbler	<i>De novo</i> Assemblierung von Sequenzdaten	Roche, Mannheim
Origin v8.0	Datenanalyse und Grafiken	Microcal Software, Northampton, USA
PAUP v4.0	Berechnung von Homoplasie und Retention Indizes	Sinauer Associates, Sunderland, USA
Primer3 v0.4.0	Entwurf von Oligonukleotid-Primern	Freeware (Rozen & Skaletsky, 2000)
Quantity One® v4.6.6	Dokumentation und Verarbeitung von Spectrophotometer Daten	BioRad, München
RAST Server	Annotation von Sequenzdaten	Freeware (Aziz <i>et al.</i> , 2008)
RegioGraph v11.0.93	Geographische Analysen	GfK GeoMarketing, Bruchsal
Sanger Artemis v12.0	Annotation von Sequenzdaten	Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK
SPSS v17.0	Statistische Datenauswertung	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Tandem Repeats Finder	Identifizierung von Wiederholungssequenzen	Freeware (Benson, 1999)
Treefinder	Berechnung/Visualisierung von Phylogrammen	Freeware (Jobb <i>et al.</i> , 2004)

## 2.2 Anzucht und Stammhaltung von *C. difficile*

### 2.2.1 Stämme von *C. difficile*

Insgesamt wurden neun *C. difficile* Referenzstämme von der *National Collection of Type Cultures* (NCTC) aus Colindale, England sowie zwei *C. difficile* und jeweils ein *Clostridium sor-dellii* (DSM 2141) und *Clostridium bifermentans* (DSM 14991) Stamm für Kontrollexperimente von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aus Braunschweig bezogen (Tab. 2.4). Bei allen übrigen Stämmen handelt es sich um klinische Isolate, welche im Rahmen nationaler und internationaler Kooperationen dem Robert Koch-Institut in Wernigerode für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt worden sind. Detaillierte Informationen zu diesen Stämmen einschließlich der Einsender und der geographischen Herkunft befinden sich im Anhang in den Tabellen A6 und A8.

**Tab. 2.4:** Zusammenstellung der von der NCTC und DSMZ bezogenen *C. difficile* Stämme

Stamm (RKI-ID)	Synonyme Bezeichnung	Herkunftsland (Stadt)	Jahr der Isolation
07-00001	NCTC 13366, R20291	UK (Stoke Mandeville)	2004
07-00002	NCTC 13404	England (Sheffield)	1978
07-00003	NCTC 11204	England (Sheffield)	1970
07-00004	NCTC 11205	England (Sheffield)	1970
07-00005	NCTC 11207	England (Sheffield)	1978
07-00006	NCTC 11223	England (Birmingham)	1978
07-00007	NCTC 12726	England (London)	1992
07-00008	NCTC 13287, R7404	Wales (Carlisle)	keine Angabe
07-00009	NCTC 13307, CD630	Schweiz (Zürich)	1980
07-00084	DSM 1296, NCTC 11209	England (Sheffield)	1978
07-00085	DSM 12056	Frankreich (Paris)	1998

### 2.2.2 Anzucht von *C. difficile* Isolaten

Die Anzucht von *C. difficile* Isolaten erfolgte auf CDAB-Platten (Oxoid, Wesel) versetzt mit 7 % defibrinierten Pferdeblut (Oxoid, Wesel) für 48 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Die Zusammensetzung des Fertigmediums ist Abschnitt 2.1.3 zu entnehmen. Als

Kohlenstoffquelle fungierte D-Fructose. Die anaerobe Atmosphäre im Anaerobiotopf wurde durch die Reduktion des atmosphärischen Sauerstoffs zu Kohlendioxid mit Hilfe des Anaero-Gen<sup>TM</sup> Kits (Oxoid, Wesel) hergestellt.

### **2.2.3 Anzucht von *C. difficile* aus Stuhlproben**

Zur Selektion von *C. difficile* Sporen wurden die Stuhlproben mit gleichen Teilen Ethanol (96 %ig) versetzt (Alkoholschock-Behandlung). Nach Durchmischung erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben auf CCFA-Platten versetzt mit 7 % defibrinierten Pferdeblut ausplattiert und für 48 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütet.

### **2.2.4 Identifizierung von *C. difficile***

Die Identifizierung von *C. difficile* erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Koloniemorphologie

*C. difficile* zeigte nach 48 stündiger Bebrütung auf CDAB-Platten 4-6 mm große, unregelmäßig geformte, sehr weiche, graue Kolonien mit gelapptem Rand. Aufgrund der Expression von para-Kresol konnte ein charakteristischer Geruch nach „Pferdestall“ nachgewiesen werden.

- Gram-Präparat

*C. difficile* ist ein Gram-positives Stäbchenbakterium mit zum Teil subterminal gelegenen Endosporen.

- PRO Kit

Das PRO Kit vertrieben von Oxoid beruht auf dem Nachweis der für *C. difficile* charakteristischen L-Prolin-aminopeptidase. Das durch den Test zur Verfügung gestellte Substrat L-Prolin-β-naphthylamin wird durch die Aminopeptidase zu L-Prolin und β-Naphthylamin hydrolysiert, wobei β-Naphthylamin mit p-Dimethylaminocinnamaldehyd zu einem roten Komplex reagiert.

### 2.2.5 Stammhaltung

Zur Induktion der Sporenbildung in der stationären Wachstumsphase wurden *C. difficile* Kulturen auf CDAB nach 48 stündiger Bebrütung bei 37 °C für weitere 48 h bei Raumtemperatur unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Zur Stammhaltung wurden Kolonien mit einem sterilen Wattestäbchen abgenommen und in einem Kyroröhrchen (1 ml) entsprechend einer McFarland-Dichte von 3-4 ( $3 \times 10^8 - 1,2 \times 10^9$  KBE/ml) resuspendiert. Die Lagerung der beimpften Röhrchen erfolgte bei -80 °C. Zur Rekultivierung wurde CDAB und kein Selektivnährboden verwendet.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Extraktion chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kits, welches die spezifischen Bindungseigenschaften von Nukleinsäuren (100 bp bis 50 kb) an Silicatsäulen unter Hochsalzbedingungen und deren Elution unter niederosmolaren Bedingungen ausnutzt. Als Vorkultur diente eine für 48 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütete *C. difficile* Kultur auf CDAB. Mit einer sterilen Impföse wurde Zellmaterial (5-7 Kolonien) abgenommen und in 200 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton X-100, 20 mg/ml Lysozym, 0,5 µg/µl RNase) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C erfolgte die weitere Aufreinigung mit Hilfe des Kits entsprechend den Angaben des Herstellers. Die chromosomale DNA wurde in 100 µl AE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 9,0, 0,5 mM EDTA) eluiert und bei -20 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle der genomischen DNA erfolgte sowohl spektralphotometrisch bei 260 nm und 280 nm als auch über ein 1 %-iges Agarosegel (s. Abschnitte 2.3.2 und 2.3.5).

### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte spektralphotometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm im SmartSpec™3000 Spectrophotometer von Bio-Rad unter Verwendung von Quarzküvetten. Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes und der



Extinktionskoeffizienten für Nukleinsäuren bei 260 nm (dsDNA  $\epsilon = 50 \text{ ng} \cdot \text{cm/ml}$ ; ssDNA  $\epsilon = 33 \text{ ng} \cdot \text{cm/ml}$ ) wurden die entsprechenden Konzentrationen durch die SmartSpec™3000 Software berechnet. Darüber hinaus ist der Absorptionskoeffizient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäuren. Reine DNA-Lösungen besitzen einen Quotienten von 1,8 bis 2, geringere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Protein, höhere Werte auf eine Verunreinigung mit RNA hin (Sambrook *et al.*, 1989).

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) können mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängige DNA-Polymerase spezifisch DNA-Fragmente amplifiziert werden (Mullis *et al.*, 1986). Die PCR in dieser Arbeit diente sowohl dem Nachweis spezifischer DNA-Elemente im Genom von *C. difficile*, als auch der Amplifikation von DNA-Fragmenten für spätere Sequenzierreaktionen oder dHPLC-Analysen. Die PCR-Reaktionen wurden in 25-50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansätzen im Thermocycler T-Professional Basic (Biometra, Göttingen) durchgeführt, wobei die Programme in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Schmelztemperaturen der Oligonukleotid-Primer variiert wurden. Die Reaktionen werden im Folgenden spezifiziert:

**PCR zum Nachweis der großen clostridialen Toxine TcdA und TcdB.** Die DNA-Amplifikation der Gene *tcdA* und *tcdB* erfolgte mit den Oligonukleotid-Primern A3C/A4N bzw. B1C/B2N entsprechend der Veröffentlichung von Rupnik *et al.*, 1997 (Tab. 2.5). Der 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz enthielt 100 – 500 ng genomische DNA, je 1  $\mu\text{M}$  Primer, 200  $\mu\text{M}$  dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x Peqlab-Reaktionspuffer Y (20 mM Tris-HCl pH 8,55, 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 % Tween 20, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), und 1,25 Units Hot Taq-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen).

Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 3 min bei 96 °C, 30 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 96 °C für 45 sec, Primerhybridisierung bei 47 °C für 45 sec und Polymerisation bei 72 °C für 3 min und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 10 min. Als Positivkontrolle beider Gene fungierte der TcdA- und TcdB- positive *C. difficile* Stamm NCTC 13366 (Ribotyp 027), als Negativkontrolle der Toxin-negative Stamm FR460 (Ribotyp 009).

**PCR zur Detektion des binären Toxins CDT.** Die DNA-Amplifikation der Gene *cdtA* und *cdtB* erfolgte mit den Oligonukleotid-Primern *cdtApos/cdtArev* bzw. *cdtBpos/cdtBrev* entsprechend der Veröffentlichung von Stubbs *et al.*, 2000 (Tab. 2.5). Der 25 µl Reaktionsansatz enthielt 50 – 250 ng genomische DNA, je 1 µM Primer, 200 µM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Reaktionspuffer Y (20 mM Tris-HCl (pH 8,55), 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween 20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), und 1,25 Units Hot Taq-DNA-Polymerase.

Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 3 min bei 96 °C, 30 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 96 °C für 45 sec, Primerhybridisierung bei 50 °C für 45 sec und Polymerisation bei 72 °C für 45 sec und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 7 min. Als Positivkontrolle beider Gene fungierte der CDT-positive *C. difficile* Stamm NCTC 13366 (Ribotyp 027), als Negativkontrolle der Toxin-negative Stamm NCTC11205 (Ribotyp 001).

**PCR zur Detektion der ORFs CDR20291\_1752 und CDR20291\_1775.** Die DNA-Amplifikation der für mobile Elemente epidemischer Ribotyp 027 Isolate charakteristischen ORFs CDR20291\_1752 und CDR20291\_1775 (konjugatives Transposon CTnCD5) erfolgte mit Oligonukleotid-Primern entsprechend der Veröffentlichung von Stabler *et al.*, 2009. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Inkubationsprotokoll entsprach der PCR zur Detektion des binären Toxins. Als Positivkontrolle fungierte der Ausbruchstamm *C. difficile* NCTC 13366.

**PCR zur Charakterisierung des negativen Toxinrepressors TcdC.** Die DNA-Amplifikation des Gens *tcdC* als Ausgangsmaterial der anschließenden Sequenzierung erfolgte mit den Oligonukleotid-Primern C1 und C2 entsprechend der Publikation von Spigaglia & Mastrantonio, 2002 (Tab. 2.5). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Inkubationsprotokoll entsprach der PCR zur Detektion des binären Toxins.

**PCR zur Charakterisierung der QRDR-Region der DNA-Gyrase Untereinheiten GyrA und GyrB.** Zur Amplifikation der QRDR-Regionen der Gene *gyrA* und *gyrB* als Ausgangsmaterial der anschließenden Sequenzierung wurden spezifische Oligonukleotid-Primer (*gyrA\_F/R*; *gyrB\_F/R*) mit Hilfe des Programms Primer3 v0.4.0 entworfen (Tab. 2.5). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Inkubationsprotokoll entsprach der PCR zur Detektion des binären Toxins.

**PCR zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen mittels dHPLC.** Zur Rekonstruktion der genetischen Populationsstruktur des *C. difficile* Ribotyps 027 wurde die Diversität neutral evolvierender Haushaltsgene analysiert. Anhand des publizierten Genoms des *C. difficile* Stammes 630 (Ribotyp 012) konnten 283 Haushaltsgene identifiziert werden, die sich

zuverlässig aus allen untersuchten Ribotyp 027 Isolaten amplifizieren ließen. Die spezifischen Oligonukleotid-Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3 v0.4.0 entworfen und sind in Tabelle A7 im Anhang aufgeführt. Der 25 µl Reaktionsansatz enthielt 15 ng genomische DNA, je 0,4 µM Primer, 200 µM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x Optimase®-Reaktionspuffer (inklusive 1,5 mM MgSO<sub>4</sub>), und 1,25 Optimase®-DNA-Polymerase (Trans-genomic, Omaha, USA). Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 2 min bei 96 °C, 30 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 96 °C für 30 sec, Primerhybridisierung bei 55 °C für 45 sec und Polymerisation bei 72 °C für 1 min und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 5 min.

**Tab. 2.5:** Für die PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µM bei -20°C gelagert.

Name	Zielgen	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)
A3C	<i>tcdA</i>	TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG	3100
A4N	<i>tcdA</i>	TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC	3100
B1C	<i>tcdB</i>	AGAAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA	3100
B2N	<i>tcdB</i>	CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG	3100
cdtApos	<i>cdtA</i>	TGAACCTGGAAAAGGTGATG	375
cdtArev	<i>cdtA</i>	AGGATTATTTACTGGACCATTG	375
cdtos	<i>cdtB</i>	CTTAATGCAAGTAAATACTGAG	510
cdtBrev	<i>cdtB</i>	AACGGATCTCTTGCTTCAGTC	510
cdiff027_1752-F	<i>CDR20291_1752</i>	CTCCTATCCGTCCTGCTGAC	676
cdiff027_1752-R	<i>CDR20291_1752</i>	TGGCCTTTTCTTTGTTGG	676
cdiff027_1775-F	<i>CDR20291_1775</i>	TGCTGCATATAGCAATTTGTGA	653
cdiff027_1775-R	<i>CDR20291_1775</i>	CTGGCTGATGGGAATGATCT	653
C1	<i>tcdC</i>	TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCC	718
C2	<i>tcdC</i>	TCTAATAAAAAGGGAGATTGTATTATG	718
gyrA_F	<i>gyrA</i>	GGACGTGCTCTTCTGATGT	573
gyrA_R	<i>gyrA</i>	TGCAGCTGTAGGAAATCTG	573
gyrB_F	<i>gyrB</i>	TTGAAGGTCAAACATAAAACAAAGC	599
gyrB_R	<i>gyrB</i>	TGGCTGTGCTGCATAAACAT	599

### 2.3.4 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Um die durch die PCR-Reaktion amplifizierte DNA von der DNA-Polymerase, überschüssigen dNTPs, Salzen und Puffern zu trennen, erfolgte eine Aufreinigung mit dem QIAquick® PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die gereinigten PCR-Fragmente wurde in 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5) eluiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden dazu benutzt, amplifizierte DNA-Fragmente und genomische DNA elektrophoretisch der Größe nach analytisch oder präparativ zu trennen. Die Elektrophorese erfolgte für hochmolekulare DNA größer 3 kb in 1 %-igen und für niedermolekulare DNA kleiner 3 kb in 1,5 %-igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose entsprechend der gewünschten Konzentration in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf 60 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Gießvorrichtung gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (GelPilot DNA Loading Dye, Qiagen, Hilden) versetzt und neben einem DNA-Längenstandard (100 bp DNA-Leiter, extended, Roth, Karlsruhe) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 70 mA in 1x TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

## 2.4 DNA-Sequenzierung

### 2.4.1 Didesoxymethode nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung diente der Charakterisierung spezifischer Allele (*tcdC*, *gyrA*, *gyrB*, Abschnitt 2.3.3), der Genotypisierung von *C. difficile* im Rahmen der molekularen Typisierung (MLST, TRST, MLVA, Kapitel 2.5) sowie der Verifizierung von Einzelnukleotidpolymorphismen in Haushaltsgenen nach erfolgter dHPLC-Analyse (Abschnitt 2.6.1). Die Sequenzierung wurde mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach dem Prinzip des Didesoxynukleotid-Kettenabbruchverfahrens nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die 10 µl Sequenzieransätze waren wie folgt zusammengesetzt: 10-20 ng gereinigtes PCR-Amplifikat, 0,65 µM Primer, 1x BigDye Terminator v3.1 Sequenzierpuffer, 1 µl BigDye 3.1, ad 10 µl Aqua bidest.. Die Reaktion wurde im Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt

und bestand aus folgenden Zyklen: initialer Denaturierungsschritt bei 96 °C für 30 sec, 25 Zyklen mit Denaturierung bei 96 °C für 10 sec, Primerhybridisierung bei 48 °C für 5 sec und Synthese bei 60 °C für 4 min und einem abschließenden Syntheseschritt bei 60 °C für 5 min. Die Reinigung der Proben über Sephadex<sup>®</sup> G-50 Säulen (GE Healthcare, München) sowie kapillargelelektrophoretische Auftrennung im 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) erfolgte im Sequenzierlabor des Robert-Koch Instituts in Berlin. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit LaserGen v8.0 und BioNumerics v6.0.

### **2.4.2 454-Pyrosequenzierung**

Im Rahmen der Arbeit wurde das Genom eines 1990 asservierten *C. difficile* Ribotyp 027 Isolats (D22/09-00072) aus Hamburg sequenziert. Die DNA-Präparation erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 dargestellt. Zur Sequenzierung wurden 7 µg chromosomale DNA an das Sequenzierlabor des Robert-Koch Instituts in Berlin gesandt. Die Sequenzierung erfolgte dort mit einem Roche 454 GS FLX Sequenzierer und dem GS FLX Titanium XLR70 Kit (Roche, Mannheim). Insgesamt wurden 267.859 Sequenzierdurchgänge (engl. *reads*) mit einer durchschnittlichen Leselänge von 396 bp und 21,68fachen Abdeckung durchgeführt. Die *de novo* Assemblierung erfolgte mit Newbler. Die Anordnung der Kontigs im Chromosom wurde mit Hilfe der Referenzsequenz des 1985 isolierten französischen Stammes CD196 (Accession FN538970) unter Verwendung von MUMmer v3.20 (Nucmer Algorithmus) und ABACAS (Assefa *et al.*, 2009; Kurtz *et al.*, 2004) abgeschätzt.

### **2.4.3 Annotation und phylogenetische Analysen**

Die Genomannotation erfolgte mit Hilfe des RAST Servers (engl. *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) basierend auf bereits annotierten Genomen (Aziz *et al.*, 2008) und anschließender manueller Korrektur mit den Programmen Kodon v3.61 und Artemis (Rutherford *et al.*, 2000).

Es sind phylogenetische Analysen basierend auf Einzelnukleotidpolymorphismen mit zum Zeitpunkt der Arbeit publizierten *C. difficile* Genomen des Ribotyps 027 durchgeführt worden (Tab. 3.7). Zur Detektion der SNPs wurde jedes Genom mit Hilfe der Programme Kodon v3.61 und MUMmer v3.20 (Nucmer Algorithmus (Kurtz *et al.*, 2004)) gegen die Sequenz des

Stammes CD196 als Referenz ausgerichtet und Punktmutationen nachgewiesen. Die detektierten SNPs wurden gegeneinander abgeglichen und Mutationen in mobilen genetischen Elementen (Prophagen, Transposons, Insertionselementen *usw.*), Wiederholungssequenzen, Bereichen von Kontig-Enden (Grenze 50 bp – Ausschluss von Sequenzierfehlern) und in möglicherweise rekombinierten und daher nicht in allen Genomen vorhandenen Regionen vom Datensatz ausgeschlossen. Die verbliebenen SNPs der einzelnen Stämme sind als phylogenetische Marker gegeneinander ausgerichtet und basierend auf dem TVM Substitutionsmodell (engl. *Transversional Model*) (Posada & Crandall, 1998) ein *Maximum Likelihood* Dendrogramm generiert worden. Die Topologie des Dendrogramms wurde durch eine *Bootstrap*-Analyse mit 1000 Wiederholungen überprüft. Alle Analysen erfolgten mit Treefinder (Jobb *et al.*, 2004).

## 2.5 Molekulare Typisierung von *C. difficile*

### 2.5.1 PCR-Ribotypisierung

Die PCR-Ribotypisierung erfasst den Längenpolymorphismus der ITS-Region zwischen 16S- und 23S-rDNA unterschiedlicher Kopien des rRNA-Operons einer Bakterienzelle. Die ITS-Regionen werden mittels PCR amplifiziert und anschließend hoch auflösend elektrophoretisch aufgetrennt, wobei den entstehenden Bandenmustern spezifische Ribotypen zugewiesen werden.

Die Amplifikation der Spacer-Regionen erfolgte mit Oligonukleotid-Primern entsprechend der Veröffentlichung von Bidet *et al.*, 1999 (Tab. 2.6). Der 50 µl Reaktionsansatz enthielt 50 – 100 ng genomische DNA, je 0,5 µM Primer, 200 µM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x Peqlab-Reaktionspuffer S (10 mM Tris-HCl pH 8,55, 50 mM KCl, 0,01 % Tween 20, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), und 1,25 Units Hot Taq-DNA-Polymerase (PeqLab). Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 6 min bei 94 °C, 35 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 94 °C für 1 min, Primerhybridisierung bei 57 °C für 1 min und Polymerisation bei 72 °C für 1 min und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate für 4 Stunden bei 85 Volt in einem 1,5 %-igen Agarosegel mit 1x TBE als Laufpuffer (DNA-Längenstandard: Invitrogen 100 bp DNA-Leiter). Um die Qualität der PCR-Reaktionen und Gele abschätzen

und wichtige epidemische Stämme korrekt zuweisen zu können sind in jedem Durchgang die *C. difficile* Stämme NCTC 13366 (Ribotyp 027) und NCTC 11205 (Ribotyp 001) mit typisiert worden. Die Zuweisung der Ribotypen erfolgte mit Hilfe einer in BioNumerics v6.0 erstellten Bibliothek von abgespeicherten Referenzmustern. Durch eine Kooperation mit dem niederländischen Referenzlabor für *C. difficile* am LUMC (Leiden University Medical Centre) in Leiden und dem deutschen Konsiliarlabor für gastrointestinale Infektionen in Freiburg konnte eine Stammsammlung von 75 Referenzstämmen internationaler Ribotypen einschließlich 25 Stämmen vom Anaerobier Referenzlabor in Cardiff, Wales am Robert Koch-Institut in Wernigerode aufgebaut werden. Isolaten, deren Bandenmuster mindestens eine Bande Unterschied zu diesen Referenzmustern aufwiesen, wurde ein Haus-interner Ribotyp mit dem Präfix „RKI“ zugewiesen.

**Tab. 2.6:** Für die PCR-Ribotypisierung verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µM bei -20°C gelagert.

Name	Zielgen	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)
A321BacS-16S	16S-rRNA	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	200-600
A322BacAS-23S	23S-rRNA	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	200-600

### 2.5.2 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Die MLST beruht auf der Analyse der Sequenzdiversität von sieben über dem Genom verteilten Haushaltsgenen (Tab. 2.7). Die Fragmente (292 bp bis 424 bp) der Gene werden mittels PCR amplifiziert, sequenziert und anhand des identifizierten Allelprofils Isolaten spezifische MLST-Sequenztypen zugewiesen.

Die PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Gene erfolgte mit Oligonukleotid-Primern entsprechend der Veröffentlichung von Lemee *et al.*, 2004 (Tab. 2.7). Die 25 µl Reaktionsansätze enthielten 50 – 250 ng genomische DNA, je 0,5 µM Primer, 200 µM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x Peqlab-Reaktionspuffer Y (20 mM Tris-HCl pH 8,55, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween 20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), und 1,25 Units Taq-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 3 min bei 96 °C, 35 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 96 °C für 45 sec, Primerhybridisierung

bei 52 °C für 45 sec und Polymerisation bei 72 °C für 45 sec und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

Die Aufreinigung der Reaktionsansätze und anschließende DNA-Sequenzierung erfolgte wie in den Abschnitten 2.3.4 und 2.4.1 dargestellt. Sequenzdaten wurden in der *C. difficile* MLST-Datenbank des Pasteur-Instituts in Paris (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Cdifficile.html>) hinterlegt, um die jeweiligen Allelprofile und daraus abgeleiteten *C. difficile* MLST-Sequenztypen zuzuweisen. Clusteranalysen basierend auf den Sequenztypen der jeweiligen Isolate erfolgten mit BioNumerics v6.0.

**Tab. 2.7:** In der MLST zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Gene verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µM bei -20°C gelagert.

Name	Zielgen	Sequenz 5' → 3'	Produktgröße (bp)
MLSTCd-aroE-F	<i>aroE</i>	CTAGTAGGTGAAAACTCTCTCA	410
MLSTCd-aroE-R	<i>aroE</i>	ACTGGTGTAGCATTTAATATTATATC	410
MLSTCd-ddl-F	<i>ddl</i>	CATAAACTTGTTTCATTGAGAAGG	424
MLSTCd-ddl-R	<i>ddl</i>	CTATGAGAAGTAAAGCCAGGAAT	424
MLSTCd-dutA-F	<i>dutA</i>	CCTAATTTTGCTCACAAAGGT	325
MLSTCd-dutA-R	<i>dutA</i>	AAATCCAGTTGAGCCAAACC	325
MLSTCd-gmk-F	<i>gmK</i>	TCAGGTGCAGGAAAAGGTAC	292
MLSTCd-gmk-R	<i>gmK</i>	TCTGTTTCTGTACCTCTTCCAAC	292
MLSTCd-recA-F	<i>recA</i>	CCAGATACAGGTGAACAGGC	379
MLSTCd-recA-R	<i>recA</i>	TTTAACATTTTCTTCTTCTTGTC	379
MLSTCd-sodA-F	<i>sodA</i>	TATSCWTATGATGCWYTWGARCC	416
MLSTCd-sodA-R	<i>sodA</i>	TARTAAGCATGYTCCCAAACATC	416
MLSTCd-tpi-F	<i>tpi</i>	GCAGGAACTGGAAAATGCATAA	395
MLSTCd-tpi-R	<i>tpi</i>	CAGATTGGCTCATATGCAACAAC	395



### 2.5.3 Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Die MLVA analysiert den Längenpolymorphismus von sieben über dem Genom verteilten Regionen mit Wiederholungssequenzen. Die Regionen werden mittels PCR amplifiziert, sequenziert und über die Sequenzanalyse die Kopiezahl der Wiederholungsregionen ermittelt. Die Kopiezahlen aller sieben Regionen ergeben einen kategorischen Datensatz, anhand dessen unabhängige Isolate diskriminiert werden können.

Die PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Wiederholungssequenzen erfolgte mit Oligonukleotid-Primern entsprechend den Veröffentlichung von Marsh *et al.*, 2006 und van den Berg *et al.*, 2007, mit Ausnahme der Loki C6 und B7, für dessen Amplifikation neue Primer mit Hilfe des Programms Primer3 v0.4.0 entworfen wurden (Tab. 2.8). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze entsprach denen der MLST. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 3 min bei 96 °C, 35 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 96 °C für 45 sec, Primerhybridisierung bei 51 °C für 45 sec und Polymerisation bei 72 °C für 45 sec und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 7 min. Die Aufreinigung der Reaktionsansätze und anschließende DNA-Sequenzierung erfolgte wie in den Abschnitten 2.3.4 und 2.4.1 dargestellt.

Die Kopiezahlbestimmung erfolgte manuell mit Hilfe des Programms *Tandem Repeats Finder* v4.0 (Benson, 1999). *Minimum Spanning* Clusteranalysen basierend auf der summierten absoluten Distanz aller sieben MLVA-Regionen wurden mit BioNumerics v6.0 durchgeführt. Die summierte absolute Distanz zwischen zwei mit der MLVA typisierten Isolaten ist die Summe aller Unterschiede zwischen den jeweiligen Wiederholungssequenzen aller sieben MLVA-Regionen (engl. *summed tandem repeat difference* – STRD). Eine STRD von  $\leq 10$  liegt wurde als genetisch nah verwandt definiert (Marsh *et al.*, 2006). Der *Minimum Spanning* Algorithmus verbindet Stämme mit der kleinsten STRD zuerst, wobei basierend auf dem eBURST-Algorithmus Einzellokusvarianten bevorzugt berücksichtigt werden (Feil *et al.*, 2004). Die Topologie wurde durch eine Permutationsanalyse mit 1000 Wiederholungen überprüft.

**Tab. 2.8:** In der MLVA zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Wiederholungssequenzen verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µM bei -20°C gelagert.

Name	MLVA-Lokus	Wiederholungsmotiv	Sequenz 5' → 3'	Quelle
MLVACd-R4-F	A6	AAGAGC	ATTAATCATATCCTACAGAACACGA	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-R4-R	A6	AAGAGC	TAAAACAAATGATATAAACTGAAAAG	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-R49-F	B7	ATCTTCT	AACATATTTAGGCATTTTAGTC	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-R49II-R	B7	ATCTTCT	TCGCTACTTTATCATCAAATTTTACA	Primer3
MLVACd-C6II-F	C6	TATTGC	CCAAGTCCCAGGATTATTGC	Primer3
MLVACd-C6II-R	C6	TATTGC	AACATGGGGATTGGAATTGA	Primer3
MLVACd-R48-F	E7	ATAGATT	AGGAGCTTTATATGGACATTCAGGTAG	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-R48-R	E7	ATAGATT	AATCTCTTTCAAACTCTTCAATCTCAAT	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-F3-F	F3	TTA	TTTTTGAAACTGAACCAACATA	van den Berg <i>et al.</i> 2007
MLVACd-F3-R	F3	TTA	ACAAAAGACTGTGCAATATACTAA	van den Berg <i>et al.</i> 2007
MLVACd-R9-F	G8	TAAAAGAG	TCTGGGATGTAAGTAGCGACTTGT	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-R9-R	G8	TAAAAGAG	TCTTAGGGAATTATTGGAGGAA	Marsh <i>et al.</i> 2006
MLVACd-H9-F	H9	TCTTCTTCC	GTTTTGAGGAAACAAACCTATC	van den Berg <i>et al.</i> 2007
MLVACd-H9-R	H9	TCTTCTTCC	GATGAGGAAATAGAAGAGTTCAA	van den Berg <i>et al.</i> 2007

#### 2.5.4 Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST)

Insgesamt 49 Regionen mit Wiederholungssequenzen konnten über die Analyse des publizierten Genoms des *C. difficile* Stammes 630 mit dem Programm *Tandem Repeats Finder* v4.0 identifiziert werden, die sich potentiell zum Aufbau eines DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile* geeignet hätten (Benson, 1999; Sebaihia *et al.*, 2006) (s. Anhang Tab. A2):

- Länge der Wiederholungseinheit: 15-40 bp
- Sequenzübereinstimmung der Einheiten: ≤ 90 %
- Kopiezahl: ≥ 5
- Gesamtlänge: ≤ 700 bp

Für die PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Wiederholungssequenzen wurden Oligonukleotid-Primer mit Hilfe des Programms Primer3 v0.4.0 in den flankierenden Bereichen der

Regionen entworfen. Die beiden Regionen mit der höchsten Variabilität, TR6 und TR10, sind zum Aufbau eines neuen Typisierverfahrens für *C. difficile*, Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST), verwendet worden.

Zur Erleichterung der Anwendung wurde eine Duplex-PCR entwickelt, die eine simultane Amplifikation und Sequenzierung beider Regionen aus einem Reaktionsansatz ermöglicht (Tab. 2.9). Die 50 µl Reaktionsansätze enthielten 100 – 500 ng genomische DNA, je 0,1 µM TR6-Primer, je 1 µM TR10-Primer, 200 µM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1x PeqLab-Reaktionspuffer Y (20 mM Tris-HCl pH 8,55, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % Tween 20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), und 1,25 Units Hot Taq-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung der genomischen DNA für 3 min bei 96 °C, 35 Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 96 °C für 45 sec, Primerhybridisierung bei 52 °C für 45 sec und Polymerisation bei 72 °C für 45 sec und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 7 min. Die Aufreinigung der Reaktionsansätze und anschließende DNA-Sequenzierung wurde wie in den Abschnitten 2.3.4 und 2.4.1 dargestellt durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte zunächst manuell und später mit Hilfe des gemeinsam entwickelten *Polymorphic VNTR typing Plugins* für BioNumerics v6.0. Die Anwendung erlaubt die automatische Assemblierung der Sequenzdaten und nachfolgende Identifizierung vorher definierter Wiederholungsmotive. Die Klassifikation von TRST-Sequenztypen erfolgte über die Abfolge der Wiederholungsallele in konkatenierten Sequenzen beider TRST-Regionen TR6 und TR10. Eine Distanzmatrix basierend auf der Allelabfolge beider Regionen wurde anhand des DSI-Modells (Benson, 1997) berechnet, ein Mutations-Model für Wiederholungssequenzen, welches sowohl Substitutionen, Insertionen oder Deletionen (Indels) als auch die Möglichkeiten von Duplikationen berücksichtigt. Nachfolgende Clusteranalysen erfolgten über den *Neighbor Joining* Algorithmus.

**Tab. 2.9:** Für die Duplex-PCR der TRST verwendete Oligonukleotid-Primer. Die Primer wurden als Stammlösung mit einer Konzentration von 50 µM bei -20°C gelagert.

Name	TRST-Region	Sequenz
TR6-F	TR6	TTTCAACTTGTCAGTTTTTAAGTC
TR6-R	TR6	ATGACATAGCGTTTGTGGAAT
TR10-F	TR10	TGCATCAAATTGGTCAAGACTC
TR10-R	TR10	TGAAATCATTGACTATAAAGCAAAA

### 2.5.5 Diskriminatorischer Index, System Konkordanz und Analysen zur molekularen Evolution

Der Diskriminatorische Index wurde berechnet, um das Auflösungsvermögen der PCR-Ribotypisierung und TRST vergleichen zu können. Der Diskriminatorische Index ist definiert als die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig gesammelte, unabhängige Isolate aus einer Bezugspopulation einen unterschiedlichen Typ aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit hängt ab von der Anzahl an Typen und deren Frequenz in der zugrundeliegenden Population. Der Diskriminatorische Index wurde unter Verwendung des Simpson-Diversitätsindex berechnet (Hunter & Gaston, 1988):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^s n_i(n_i-1)$$

$D$  = Diskriminatorischer Index

$S$  = Anzahl der Typen

$n_i$  = Anzahl der Isolate, die zu Typ  $i$  gehören

$N$  = Anzahl der getesteten Isolate.

Die Berechnung der Konfidenzintervalle erfolgte nach Grundmann *et al.*, 2001. Die Konkordanz zwischen zwei Typisierverfahren wurde anhand des bereinigten Rand- und Wallace-Koeffizienten ermittelt (Carrico *et al.*, 2006). Während der Rand-Koeffizient eine quantitative Einschätzung der gesamten Übereinstimmung zweier Typisierverfahren erlaubt, vergleicht der Wallace-Koeffizient die Kongruenz von zwei Verfahren in Abhängigkeit der Richtung der Typisierung, also die Wahrscheinlichkeit, ob ein Paar von Isolaten mit dem selben Typ im ersten System auch den selben Typ im zweiten System aufweist und umgekehrt. Die Berechnung der Parameter erfolgte mit Hilfe des Programms EpiCompare v1.0.

Die Nukleotid-Diversität ( $\pi$ ) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei zufällig ausgewählte homologe Nukleotide aus einer Bezugspopulation unterschiedlich sind. Sie ist ein Maß für die Variabilität eines bestimmten Bereichs des Genoms und beschreibt die durchschnittliche Anzahl der Nukleotidunterschiede einer Sequenz zwischen zwei zufällig ausgesuchten Proben einer Bezugspopulation.

Das normalisierte Verhältnis zwischen nicht-synonymen ( $K_a$ ) Nukleotidsubstitutionen, bei denen Änderungen im genetischen Kodontriplett zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen und synonymen ( $K_s$ ) Substitutionen, bei der das veränderte Triplet durch den degene-

rierten genetischen Code für die identische Aminosäure codiert, erlaubt Rückschlüsse auf Selektionsvorgänge eines bestimmten genomischen Bereichs. Während ein Verhältnis  $Ka/Ks < 1$  auf eine stabilisierende Selektion (engl. *purifying selection*) der Sequenz hinweist, könnte ein Wert  $= 1$  auf eine neutrale und ein Wert  $> 1$  auf eine positive Selektion (engl. *diversifying selection*) hindeuten (Nei & Gojobori, 1986). Beide Parameter, die Nukleotid-Diversität ( $\pi$ ) und das Verhältnis  $Ka/Ks$ , wurden mit dem Programm DnaSP v4.5 berechnet.

Die Bestimmung von Homoplasie und Retention Indizes als Maß für die konvergente Entwicklung identischer MLVA-Profile erfolgte mit PAUPv4.0 (Sinauer Associates, Sunderland, USA). Ein Homoplasie Index von 0 bedeutet keine Homoplasie im Datensatz, ein Wert von 1 dagegen, dass alle Merkmale homoplastisch sind. Beim Retention Index ist es genau umgekehrt. Die statistische Auswertung von Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Signifikanzen wurden mit Hilfe des Levene und Student T-Tests berechnet. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  galt als signifikant.

## 2.6 Analytische Methoden

### 2.6.1 Nachweis von SNPs mittels denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dHPLC)

Durch die denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. *denaturing high performance liquid chromatography*, dHPLC) lassen sich hoch sensitiv Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) heterogener DNA-Fragmente detektieren (Nübel *et al.*, 2008; Oefner & Underhill, 1995). Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Fähigkeit der Säulenmatrix doppelsträngige DNA zu binden und diese zu entlassen, wenn die Helix entwunden wird, so dass feine Unterschiede in den Schmelzkurven der DNA nachgewiesen werden können. Entscheidend für detektierbare Unterschiede ist die Bildung von Heteroduplices mit Basenpaarungen außerhalb des Watson-Crick-Systems (G-T und A-C), die durch Vermischung von PCR-Amplikons unterschiedlicher Allele eines Gens durch Denaturierung und anschließender langsamer Renaturierung entstehen und eine deutlich geringe Retentionszeit an der Matrix besitzen als Homoduplices nur eines Allels. Auf diese Weise lassen sich große Probensätze amplifizierter Genfragmente auf Mutationen vorselektieren und die meisten DNA-Sequenzierungsreaktionen einsparen.

Zur Rekonstruktion der genetischen Populationsstruktur des *C. difficile* Ribotyps 027 wurde die Diversität von 283 Haushaltsgenen (Fragmentlänge von 450-500 bp) innerhalb einer

Stammsammlung von 60 internationalen Isolaten gegenüber einem deutschen Isolat (P5433) als Referenzsequenz mit Hilfe der dHPLC analysiert (s. Anhang Tab. A7). Die Amplifikation der Gene mittels PCR erfolgte entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.3.3. Die Amplikons wurden im gleichen Verhältnis mit der Referenz-DNA gemischt und für 5 min bei 96 °C denaturiert (Simplexansatz). Bei phylogeographisch assoziierten Stämmen konnte genomische DNA von bis zu 10 Isolaten und einer identischen Konzentration von 15 ng/µl vor der PCR mit der DNA des Referenzstammes gemischt und nach erfolgter Amplifikation direkt denaturiert werden (Multiplexansatz). Anschließend wurde die Proben schrittweise (5 °C pro Minute) auf 12 °C zur Renaturierung abgekühlt, wobei es im Fall von Sequenzvariabilität neben der Reassoziationsidentischer Einzelstränge zur Ausbildung von Heteroduplices von Strängen unterschiedlicher Allele gekommen ist.

Für die dHPLC-Analyse wurde das Wave<sup>®</sup>-System der Firma Transgenomic (Omaha, USA) mit der entsprechenden Software Navigator<sup>™</sup> und MethodPredict<sup>™</sup> verwendet. Entscheidend für die chromatographische Trennung sind partiell denaturierende Bedingungen, um Heteroduplices aufgrund ihrer Sequenz von Homoduplices gleicher Länge differenzieren zu können. Entsprechend musste vor jedem Lauf für jedes amplifizierte Gen mit Hilfe des Programms MethodPredict<sup>™</sup> eine exakte Analysetemperatur ermittelt und ein spezifisches Methodenprotokoll mit der Navigator<sup>™</sup> Software erstellt werden (Tab. A7 im Anhang). Als Laufpuffer dienten 0,1 M TEAA (Triethylammoniumacetat) pH 7,0 (Puffer A) und 0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril (Puffer B). Das amphipatische TEAA sorgt für die Bindung der DNA an die hydrophoben Polystyren-Divinylbenzol Partikeln der Säule, während das Acetonitril denaturierend wirkt und eine Konzentrationserhöhung von 0,8 % einer Temperaturerhöhung von 1 °C entspricht (Xiao *et al.*, 2001). Die Proben wurden mittels eines Autosamplers mit einem Injektionsvolumen von 5 µl auf die DNASep<sup>®</sup> HT Säule aufgetragen und über einen auf das jeweilige DNA-Fragment angepassten, linearen Acetonitril Gradienten von der Säule eluiert. Die eluierte DNA wurde im UV-Detektor bei 254 nm registriert und die Chromatogramme mit der Navigator<sup>™</sup> Software ausgewertet. Die abschließende Verifizierung der detektierten Mutationen erfolgte über eine DNA-Sequenzierung wie in Abschnitt 2.4.1 dargestellt.

## 2.6.2 Antibiotikaresistenztestung mittels Epsilon-Tests

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von *C. difficile* gegenüber Metronidazol, Vancomycin und den Fluorchinolonen Levofloxacin und Moxifloxacin erfolgte durch den Epsilon-Test (E-Test – AB Biodisk, Solna, Schweden). Der E-Test ist eine Variante des Agardiffusionstests, bei der ein Teststreifen (E-Test-Streifen) mit definiertem, exponentiellem Antibiotikumgradienten auf eine Agarplatte aufgebracht wird. Durch die anschließende Diffusion des Antibiotikums in die Peripherie entsteht ein elliptischer Antibiotikumgradient im Agar und Bakterien wachsen unter der Bildung eines Hemmhofes bis zum Erreichen ihres MHK-Wertes an den Streifen heran. Aufgrund einer kalibrierten Skala der Verdünnungsstufen auf dem E-Test-Streifen kann der MHK-Wert ermittelt werden.

Zur Durchführung wurde Zellmaterial ausgehend von einer frischen Reinkultur, welche mindestens in zwei Passagen an nicht-selektives Nährmedium adaptiert worden ist, mittels eines sterilen Wattestäbchens abgenommen und in 3 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung homogen resuspendiert. Die resultierende Trübung sollte einer McFarland-Dichte von 1 ( $3 \times 10^8$  KBE/ml) entsprechen. Die Suspension wurde anschließend homogen auf eine für 12 Stunden unter anoxischen Bedingungen präreduzierte CDAB-Platte mit 7 % Pferdeblutzusatz ausplattiert. *C. difficile* Isolate sollten dabei nicht länger als 30 Minuten der Luft exponiert werden. Pro Platte wurden anschließend maximal zwei E-Test-Streifen mit umgekehrter Orientierung appliziert. Nach einer Inkubation für 12 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen wurde der Schnittpunkt des Hemmhofes mit der Skala des E-Test-Streifens als MHK-Wert entsprechend den Angaben des Herstellers ermittelt. Die Interpretation der MHK-Werte erfolgte nach den EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) Richtlinien (<http://www.eucast.org>, Tab. 2.10). Als Kontrollstämmen der Testreihen fungierten *C. difficile* NCTC13307 (PCR-Ribotyp 012) und *C. difficile* NCTC13366 (PCR-Ribotyp 027).

**Tab. 2.10:** MHK-Grenzwerte für Metronidazol, Vancomycin, Levofloxacin und Moxifloxacin nach EUCAST\*

Antibiotikum	MHK Grenzwert (mg/L)	
	S ≤	R >
Metronidazol	4	4
Vancomycin	2	2
Levofloxacin	1	2
Moxifloxacin	0,5	1

\* *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

S = sensibel; R = resistent

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Molekulare Epidemiologie von *C. difficile*

Die Inzidenz *C. difficile*-assoziierter Erkrankungen ist in den letzten Jahren weltweit signifikant gestiegen (Kuijper *et al.*, 2006a; Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2006; Zilberberg *et al.*, 2008). In Nordamerika war der Anstieg zum Teil mit der Ausbreitung hoch virulenter, multiresistenter Epidemiestämme assoziierbar, die als PCR-Ribotyp 027 charakterisiert wurden (Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005). Ausbrüche nosokomialer Infektionen mit Stämmen identischer Typisierungsmuster konnten ebenfalls in mehreren europäischen Ländern nachgewiesen werden (Kuijper *et al.*, 2008). Da in Deutschland bisher keine bundesweiten Daten über die Verteilung der verschiedenen *C. difficile* Ribotypen und deren Antibiotikaresistenz existierten, war eine Assoziation des seit 2000 beobachteten Inzidenzanstieges der CDI mit bestimmten Typen bisher nicht möglich (Vonberg *et al.*, 2007). Dementsprechend wurde 2008 eine Studie initiiert, in dessen Rahmen Isolate aus schweren Verläufen molekular typisiert und Resistenzprofile erstellt wurden (Zaiß *et al.*, 2010).

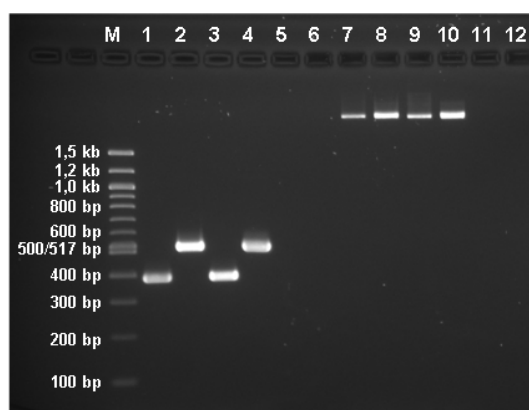
#### 3.1.1 Erster Nachweis des *C. difficile* PCR-Ribotyps 027 in Deutschland

Über die Etablierung der PCR-Ribotypisierung am Robert Koch-Institut erfolgte im August 2007 retrospektiv der erste Nachweis einer schweren Infektion aufgrund des *C. difficile* Ribotyps 027 in Deutschland. Das Isolat (JW608204) stammte von einem 76 jährigen Patienten, der Anfang Januar 2007 aufgrund einer Ellenbogenfraktur stationär in ein Stuttgarter Krankenhaus aufgenommen wurde. Postoperativ entwickelte der Patient eine Wundinfektion, dessen Folge eine Antibiose mit zuerst Amoxicillin/Clavulansäure, später Cefalexin und zuletzt Imipenem/Cilastatin war. Daraufhin entwickelte der Patient Ende März 2007 eine schwere Pseudomembranöse Kolitis und Pneumonie, worauf *C. difficile* aus Stuhlproben isoliert werden konnte. Drei Tage später kam es zum Multiorganversagen bei septischen Schock, so dass der Patient verstarb.

Das aus einer Stuhlprobe des Patienten stammende *C. difficile* Isolat des PCR-Ribotyps 027 wurde weiter molekular charakterisiert. Es konnten sowohl die Gene der beiden großen Zytotoxine TcdA und TcdB als auch die Gene der katalytischen (*cdtA*) und Bindedomäne (*cdtB*)



der Aktin-spezifischen ADP-Ribosyltransferase („binäre Toxin“) mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Das Gen des Toxinrepressors TcdC wurde amplifiziert und sequenziert. Über eine BLAST-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Repressorgen sowohl die charakteristische 18 bp Deletion als auch Einzelnukleotiddeletion an Position 117 aufwies (Allel *tcdC-scI*) (Curry *et al.*, 2007; Warny *et al.*, 2005).



**Abb. 3.1: Nachweis der binären und großen clostridialen Toxingene mittels PCR.** Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung zum Nachweis der Amplikons. Spur M: Molekulargewichtsstandard 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, Frankfurt); Spuren 1-6: Nachweis der Gene *cdtA* (375 bp - 1, 3, 5) und *cdtB* (510 bp - 2, 4, 6) des binären Toxins CDT; Spuren 1, 2: *C. difficile* JW608204; Spuren 3, 4: Positivkontrolle *C. difficile* NCTC13366; Spuren 5, 6: Negativkontrolle *C. difficile* FR460; Spuren 7-12: Nachweis der Gene *tcdA* (3,1 kb - 7, 9, 11) und *tcdB* (3,1 kb - 8, 10, 12); Spuren 7, 8: *C. difficile* JW608204; Spuren 9, 10: Positivkontrolle *C. difficile* NCTC13366; Spuren 11, 12: Negativkontrolle *C. difficile* FR460.

Die Antibiotikaresistenztestung mittels Epsilometer-Tests ergab, dass das Isolat empfindlich gegen Clindamycin, Doxycyclin und die Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin war, aber Resistenzen gegenüber Erythromycin, Imipenem und Moxifloxacin aufwies (Tab. 3.1). Identische Resistenzprofile konnten bei epidemischen Stämmen des Ribotyps in Nordamerika und anderen europäischen Staaten nachgewiesen werden (Barbut *et al.*, 2007; Brazier *et al.*, 2008; Kuijper *et al.*, 2006b; McDonald *et al.*, 2005). Dementsprechend deuten neben der Typisierung sowohl das Toxinprofil, das charakteristische *tcdC*-Allel als auch das Antibiogramm darauf hin, dass erstmals ein schwerer Verlauf einer CDI durch einen *C. difficile* Stamm des Ribotyps 027 in Deutschland nachgewiesen werden konnte (Zaiß *et al.*, 2007). Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob es sich hierbei um die klonale Ausbreitung eines epidemischen Stammes oder eine konvergente Entwicklung handelt und inwieweit die stark gestiegene Inzidenz *C. difficile*-assoziierter Erkrankungen in Deutschland mit der Ausbreitung des Ribotyps 027 assoziierbar ist. Dadurch, dass weitere Isolate aus demselben

Krankenhaus andere Ribotypen aufwiesen, konnte ein Ausbruchsgeschehen ausgeschlossen werden.

**Tab. 3.1: Resistenzbestimmung des *C. difficile* Stammes JW608204 gegenüber ausgewählten Antibiotika.** Die Resistenztestung erfolgte mittels des Epsilon-Meter-Tests.

Antibiotikum	MHK (mg/l)	Interpretation *
Erythromycin	>256	R
Imipenem	8	R
Vancomycin	0,5	S
Clindamycin	2	S
Moxifloxacin	>32	R
Metronidazol	0,125	S
Doxycyclin	0,023	S

Interpretation der MHK-Werte nach EUCAST ([www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/));

S= sensibel; R = resistent

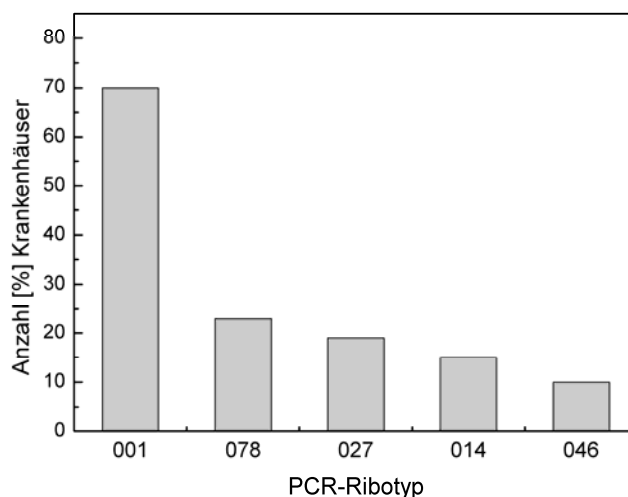
### 3.1.2 Erste bundesweite Daten über die *C. difficile* Ribotypverteilung in Deutschland

Im Rahmen einer Surveillance Studie wurden von Januar bis Dezember 2008 insgesamt 670 Isolate aus schweren Infektionen, isoliert in 84 Krankenhäusern aus dem gesamten Bundesgebiet, zur molekularen Typisierung an das Robert Koch-Institut in Wernigerode gesandt.

Als schwerer Verlauf wurde ein CDI-Fall definiert, wenn eines der folgenden vier Kriterien erfüllt war (Definition gemäß §6 Abs. 1 Nr.5a Infektionsschutzgesetz):

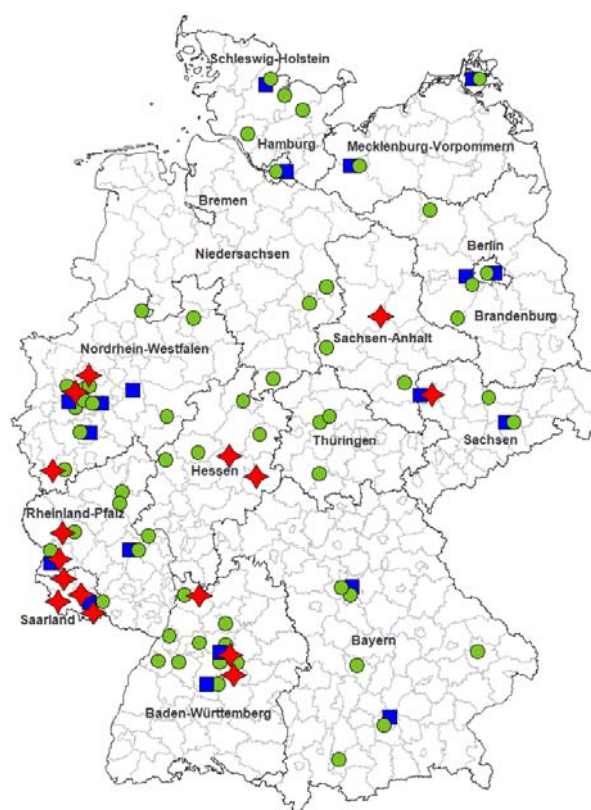
1. Notwendigkeit einer Wiederaufnahme aufgrund einer rekurrenten Infektion,
2. Verlegung auf eine Intensivstation zur Behandlung der CDI oder ihrer Komplikationen,
3. chirurgischer Eingriff (Kolektomie) aufgrund eines Megakolons, einer Darmperforation oder einer Therapie-refraktären Kolitis,
4. Tod < 30 Tage nach Diagnosestellung und CDI als Ursache oder als zum Tode beitragende Erkrankung.

Die molekulare Typisierung der Isolate erfolgte mit Hilfe der PCR-Ribotypisierung (Bidet *et al.*, 1999), wobei insgesamt 57 unterschiedliche Ribotypen nachgewiesen werden konnten (Tab. A1). 312 Isolate wurden durch den Ribotyp 001 charakterisiert (47 %), gefolgt von je 53 Isolaten (8 %) der Ribotypen 078 und 027. Um eine Überrepräsentierung von Ausbruchsisolaten zu verhindern, wurde der Nachweis der fünf häufigsten Ribotypen im Verhältnis zur Anzahl der einsendenden Krankenhäuser ermittelt (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Prävalenz der fünf häufigsten *C. difficile* PCR-Ribotypen aus schweren Infektionsverläufen in deutschen Krankenhäusern, 2008.** Insgesamt 84 unterschiedliche Krankenhäuser haben 2008 *C. difficile* Isolate zur molekularen Typisierung an das Robert Koch-Institut in Wernigerode gesandt. Ribotyp 001 war verantwortlich für schwere Infektionen in 59 Krankenhäusern (70 %), gefolgt von Ribotyp 078 (19 Krankenhäuser, 23 %), Ribotyp 027 (16 Krankenhäuser, 19 %), Ribotyp 014 (13 Krankenhäuser, 15 %) und Ribotyp 046 (8 Krankenhäuser, 10 %).

Ribotyp 001 war 2008 bei weitem der prävalenteste Ribotyp in Deutschland, verantwortlich für schwere Infektionen in 70 % der einsendenden Krankenhäuser. Der Nachweis erfolgte dabei gleichmäßig über das gesamte Bundesgebiet verteilt (Abb. 3.3). Der zweithäufigste Ribotyp war Ribotyp 078, der in 23 % der Krankenhäuser nachgewiesen werden konnte und ebenfalls relativ gleichmäßig verteilt in Deutschland auftrat. Im Gegensatz dazu war die Verbreitung des Ribotyps 027, der in 16 unterschiedlichen Krankenhäusern (19 %) identifiziert wurde, 2008 vor allem auf den Südwesten von Deutschland beschränkt mit nur zwei sporadischen Fällen in Ostdeutschland. Weiterhin konnten Isolate der Ribotypen 014 und 046 in 15 % und 10 % der teilnehmenden Krankenhäuser ermittelt werden.



**Abb. 3.3:** Geographische Ausbreitung der *C. difficile* PCR-Ribotypen 001, 078 und 027 in deutschen Krankenhäusern, 2008. Grüne Punkte kennzeichnen Krankenhäuser mit *C. difficile* Ribotyp 001 Infektionen, blaue Quadrate Krankenhäuser mit Ribotyp 078 Infektionen und rote Sterne Krankenhäuser mit Ribotyp 027 Nachweis.

### 3.1.3 Erste bundesweite Daten zur Antibiotikaresistenz von *C. difficile* aus schweren Infektionsverläufen in Deutschland

Eine zunehmende Antibiotikaresistenz wäre neben der erhöhten Inzidenz Antibiotika-induzierter Koliden mitverantwortlich für die selektierte Verbreitung resistenter, möglicherweise stärker virulenter Stämme und würde damit maßgeblich zu einer veränderten Epidemiologie des Erregers beitragen. Da vor allem die Behandlung mit Fluorchinolonen neuerer Generationen in den letzten Jahren vermehrt als unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte CDI-Inzidenz identifiziert werden konnte, wurden neben den Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin ausgewählte Isolate auf Resistenz gegenüber Moxifloxacin und Levofloxacin getestet (Gaynes *et al.*, 2004; Muto *et al.*, 2005; Pepin *et al.*, 2005). Die Empfindlichkeitstestung erfolgte mit Hilfe des Epsilon-Meter-Tests (E-Test) mit Grenzwerten entsprechend den EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) Richtlinien.

Die Antibiotikaresistenztestung ergab, dass alle getesteten Isolate empfindlich gegenüber den Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin waren. Tabelle 3.2 zeigt die für Metronidazol und Vancomycin ermittelten MHK-Mittelwerte der sieben häufigsten Ribotypen. Im Gegensatz zu einer vorherigen Studie aus England konnten keine signifikant erhöhten MHK-Werte für Metronidazol für die epidemischen Ribotypen 001, 078 und 027 im Vergleich zu den weniger prävalenten Typen 014, 046, 012 und 015 nachgewiesen werden ( $p = 0,12$  Student T-Test) (Brazier *et al.*, 2008).

**Tab. 3.2:** MHK-Mittelwerte der sieben häufigsten *C. difficile* PCR-Ribotypen für die Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin. Die Resistenzbestimmung erfolgte mittels Epsilometer-Tests.

PCR-Ribotyp	Metronidazol MHK-Mittelwert (mg/l)	Vancomycin MHK-Mittelwert (mg/l)
001 (n = 303)	0,056	1,54
078 (n = 46)	0,071	1,6
027 (n = 51)	0,06	1,42
014 (n = 21)	0,05	1,58
046 (n = 14)	0,041	1,55
012 (n = 14)	0,054	1,96
015 (n = 6)	0,071	1,92

Deutsche Isolate der Ribotypen 001, 027 und 014 zeigten nahezu alle MHK-Werte  $> 32$  mg/l für die Fluorchinolone Levofloxacin und Moxifloxacin, Resistenzen traten aber, wenn auch weniger häufig, in allen anderen getesteten Ribotypen auf (Tab. 3.3). In zahlreichen Studien konnte die Fluorchinolonresistenz von *C. difficile* mit Mutationen im aktiven Zentrum der DNA-Gyrase assoziiert werden (Ackermann *et al.*, 2001; Dridi *et al.*, 2002; Spigaglia *et al.*, 2008; Walkty *et al.*, 2010). Die DNA-Sequenzanalyse der Gene der beiden Untereinheiten *gyrA* und *gyrB* ergab, dass fast alle resistenten Isolate unabhängig vom Ribotyp die identische Transitionsmutation (ACT zu ATT) in *gyrA* teilten, die zu einer Aminosäuresubstitution Thr-82→Ile führte (Tab. 3.3). Ein Isolat des Ribotyps 001 besaß neben der Thr-82→Ile eine zusätzliche Asp-71→Glu (GAC zu GAA) Mutation und bei einem Isolat des Ribotyps 078, welches eine hohe Resistenz gegenüber Levofloxacin (MHK  $> 32$  mg/l) und ein niedriges Resistenzlevel gegen Moxifloxacin (MHK = 2 mg/l) aufzeigte, konnte stattdessen eine Thr-82→Ala (ACT zu GCT) Substitution nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen zwei Isolate der Ribotypen 078 und 014 eine hohe Resistenz gegen beide Fluorchinolone im Zusam-

menhang mit einer Asp-426→Asn (GAT zu AAT) beziehungsweise Glu-466→Lys (GAA zu AAA) in *gyrB* auf, während keine Mutationen im Gen *gyrA* identifiziert werden konnten.

**Tab. 3.3: Fluorchinolonresistenz und assoziierte DNA-Gyrase Mutationen innerhalb der fünf prävalentesten *C. difficile* PCR-Ribotypen in Deutschland, 2008.** Die Antibiotikaresistenzbestimmung gegenüber Moxifloxacin und Levofloxacin erfolgte mittels des Epsilometer-Tests mit MHK-Grenzwerten nach EUCAST.

PCR-Ribotyp	Anzahl der Isolate	Resistenz gegen Moxifloxacin		Resistenz gegen Levofloxacin		Aminosäure Substitution	
		Anzahl resistenter Isolate (%)	[MHK > 1 mg/l]	Anzahl resistenter Isolate (%)	[MHK > 2 mg/l]	GyrA	GyrB
001	303	301	(99)	301	99	Thr-82-Ile Asp-71-Glu	
078	46	29	(63)	30	65	Thr-82-Ile; Thr-82-Ala	Asp-426-Asn
027	51	51	(100)	51	100	Thr-82-Ile	
014	21	2	(9)	2	9	Thr-82-Ile	Glu-466-Lys
046	14	14	(100)	14	100	Thr-82-Ile	

Die *gyrA* Mutationen Thr-82→Ala und Asp-71→Glu wurden bisher noch nicht für *C. difficile* beschrieben. Allerdings konnten zahlreiche Aminosäuresubstitutionen an beiden Positionen vorher beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass Thr-82 und Asp-71 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der Fluorchinolonresistenz in *C. difficile* spielen (Ackermann *et al.*, 2001; Spigaglia *et al.*, 2008; Walkty *et al.*, 2010). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass Fluorchinolonresistenz durch identische Mutationen mehrfach konvergent in unterschiedlichen Ribotypen entstanden ist und damit nicht der alleinige Selektionsvorteil für die starke Prävalenz des Ribotyps 001 bzw. die mögliche Ausbreitung des Ribotyps 027 darstellen kann.

### 3.2 Entwicklung eines neuen DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile*

Das Ziel der nachfolgenden Experimente war die Etablierung eines neuen Typisierverfahrens für *C. difficile*, welches in Analogie zur *spa*-Typisierung von *Staphylococcus aureus* auf der DNA-Sequenzanalyse einer hochvariablen Region mit Wiederholungssequenzen (engl. *tandem repeat*) im Genom von *C. difficile* beruht (Frenay *et al.*, 1996; Harmsen *et al.*, 2003). Den Wiederholungsmotiven dieser Region sollten aufgrund eines ausgeprägten Sequenzpo-

lymorphismus spezifische Allele zugewiesen und anhand der Anzahl und Reihenfolge der Allele spezifische Sequenztypen von *C. difficile* abgeleitet werden können. Die Eignung eines solchen Verfahrens zur routinemäßigen Typisierung von *C. difficile* wurde anhand etablierter Typisierungsmethoden wie der PCR-Ribotypisierung, MLST und MLVA evaluiert.

### 3.2.1 Identifizierung geeigneter repetitiver Regionen zum Aufbau eines DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile*

Über die Analyse des im Juli 2006 veröffentlichten, vollständig sequenzierten Genoms des *C. difficile* Stammes 630 mit dem Programm *Tandem Repeats Finder* v4.0 konnten insgesamt 49 Regionen mit Wiederholungssequenzen identifiziert werden, die sich potentiell zum Aufbau eines DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile* geeignet haben (Tab. A2) (Benson, 1999; Sebahia *et al.*, 2006). Um eine ausreichend diskriminierende Längen- und Sequenzdiversität der repetitiven Regionen gewährleisten zu können, wiesen die Wiederholungssequenzen als Auswahlkriterium eine Länge der Wiederholungseinheit von mindestens 15 bis maximal 40 Basenpaaren (bp), eine Sequenzübereinstimmung der Einheiten von  $\leq 90\%$  und eine Kopiezahl von  $\geq 5$  auf. Um eine hohe Sequenzqualität zu sichern sollte eine Gesamtlänge von 700 bp nicht überschritten werden.

Für 36 dieser Regionen war es möglich, Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifizierung zu generieren, welche in den flankierenden Bereichen der Regionen ansetzten. Von 28 Regionen konnten zuverlässig PCR-Amplifikate aus einer Auswahl von 12 Referenzisolaten erhalten werden. Bei 25 dieser repetitiven Regionen war die Sequenzdiversität nicht ausreichend, um häufig auftretende Epidemiestämme der PCR-Ribotypen 001, 017 und 027 zu diskriminieren. Die Sequenzierung der verbliebenen drei Regionen ermöglichte die Unterscheidung der meisten Ribotypen. Die Regionen mit der höchsten Sequenzvariabilität und dadurch mit dem stärksten Diskriminierungsvermögen wurden als repetitive Region TR6 (TR –engl. *tandem repeat*) und TR10 bezeichnet (Tab. 3.4).

Die Region TR6 befand sich an Position 0,72 Mb auf dem *C. difficile* 630 Chromosom und setzte sich aus Wiederholungseinheiten mit einer Länge von 21 bp zusammen. TR6 lag innerhalb des offenen Leserasters eines hypothetischen Proteins (ORF CD0603 des *C. difficile* 630 Genoms). Eine Homologie-Analyse in öffentlich zugänglichen Sequenz- und Proteindatenbanken konnte weder signifikante Ähnlichkeiten mit bereits charakterisierten Proteinen noch konservierten Proteindomänen identifizieren.

**Tab 3.4:** Charakteristika der Wiederholungssequenzen TR6 und TR10.

Wiederholungs-region <sup>a</sup>	Position im Genom <sup>b</sup>	Länge der Wiederholungseinheit (bp)	Kopiezahl <sup>c</sup>	Anzahl der Allele der Wiederholungseinheiten <sup>c</sup>	Konsensussequenz der Wiederholungseinheit
TR6	725321 : 725600	21	7-37	80	CTTGCAACCACTAATAGTGC
TR10	3753166 : 3753574	22-23	4-26	51	AAATTAATTATTATTTCTTT

<sup>a</sup> engl. *tandem repeat* - TR

<sup>b</sup> Position im Genom des *C. difficile* Stammes 630 (Sebahia *et al.*, 2006)

<sup>c</sup> Basierend auf der Analyse von 154 typisierten Isolaten

Im Gegensatz zur Region TR6 befanden sich die Wiederholungseinheiten der Region TR10 an Position 3,75 Mb im intergenetischen Bereich, flankiert 230 bp stromabwärts von einem offenen Leseraster eines hypothetischen Proteins (ORF CD3206) und 7 bp stromaufwärts von einer hypothetischen Na<sup>+</sup>-abhängigen MDR (engl. *multidrug resistance*) Effluxpumpe (CD3207). Die Länge der Wiederholungseinheiten variierte zwischen 22 und 23 bp.

Beide Regionen besaßen sowohl einen diskriminierenden Längenpolymorphismus aufgrund von Unterschieden in der Kopiezahl der Wiederholungseinheiten (Tab. A3), als auch eine diskriminierende Sequenzdiversität aufgrund von Mutationen innerhalb der Wiederholungsmotive (Tab. A4-5). Im folgenden Abschnitt wird auf die Typisierbarkeit von *C. difficile* Isolaten und das Diskriminierungsvermögen beider Regionen im Vergleich zum gegenwärtig in Europa eingesetzten Standardverfahren zur Typisierung von *C. difficile*, der PCR-Ribotypisierung, eingegangen.

### 3.2.2 Typisierbarkeit und Diskriminierungsvermögen der repetitiven Regionen TR6 und TR10 im Vergleich zur PCR-Ribotypisierung

Der Nachweis der Typisierbarkeit von *C. difficile* mit Hilfe der beiden repetitiven Regionen und die Charakterisierung des Diskriminierungsvermögens im Vergleich zur PCR-Ribotypisierung erfolgte anhand einer internationalen Stammsammlung von 154 Isolaten. Die Stammsammlung bestand sowohl aus 62 Referenzstämmen unterschiedlicher Ribotypen aus England, Slowenien, Schweden und Deutschland als auch aus 92 im Rahmen einer Studie gesammelten klinischen Isolaten aus 15 verschiedenen deutschen Krankenhäusern. Die Stämme wurden hinsichtlich einer maximalen Diversität basierend auf der Verteilung der PCR-Ribotypen und der geographischen Herkunft ausgewählt und umfassten insgesamt 75 ver-



schiedene PCR-Ribotypen (Tab. A6). Die beiden Tandemwiederholungssequenzen TR6 und TR10 ließen sich aus allen 154 Isolaten amplifizieren, was einer Typisierbarkeit von 100 % entsprach. Die PCR-Amplifizierung beider Regionen aus *Clostridium sordellii* und *Clostridium bifermentans* erfolgte mit negativem Ergebnis.

Basierend auf dem Längen- und Sequenzpolymorphismus der repetitiven Region TR6 wurden insgesamt 43 unterschiedliche Sequenztypen innerhalb der 154 Isolate unterschieden (Diskriminatorischer Index (DI) = 0,93; Tab. 3.5). Damit konnte die Region TR6 innerhalb der untersuchten Stämme deutlich weniger Typen als die PCR-Ribotypisierung diskriminieren (43 TR6 Sequenztypen gegenüber 75 Ribotypen; DI = 0,93 gegenüber DI = 0,97). Insgesamt waren die Sequenzen der Wiederholungseinheiten der Region TR6 hoch variabel mit einer Sequenzdiversität  $\pi$  von  $0,28 \pm 0,01$  und es wurden innerhalb der 43 Sequenztypen 80 unterschiedliche Allele der Wiederholungseinheiten aufgrund von Punktmutationen identifiziert. Die Kopiezahl der Einheiten variierte zwischen 7 bis 37, was zu einer Längendiversität der Region TR6 von 147 bis 777 bp führte (Tab. 3.4).

Im Vergleich zur Region TR6 besaß die Region TR10 ein leicht höheres Diskriminierungsvermögen (DI = 0,95) und es konnten insgesamt 53 unterschiedliche TR10 Sequenztypen innerhalb der 154 Isolate unterschieden werden (Tab. 3.5). Die Kopiezahl variierte zwischen 4 und 26 Wiederholungseinheiten, was zu einem Längenpolymorphismus der Region von 88 bis 576 bp führte und es konnten aufgrund einer hohen Sequenzdiversität  $\pi$  von  $0,23 \pm 0,01$  51 unterschiedliche Wiederholungsmotive innerhalb der 53 Sequenztypen nachgewiesen werden.

**Tab 3.5: Diskriminierungsvermögen und Konkordanz der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung und PCR-Ribotypisierung**

Methode	Anzahl der Stämme	Anzahl unterschiedlicher Typen	Diskriminatorischer Index	95 % KI	Konkordanz mit Ribotypisierung <sup>a</sup> (%)
PCR-Ribotypisierung	154	75	0,967	0,953 – 0,982	n. a.
TRST <sup>b</sup>	154	72	0,967	0,954 – 0,981	89,8
TR6 Sequenzierung	154	43	0,931	0,911 – 0,951	60,4
TR10 Sequenzierung	154	53	0,949	0,934 – 0,964	71,6

<sup>a</sup> Bereinigter Rand Koeffizient

<sup>b</sup> Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung - Kombination der TR6 and TR10 Sequenzen

Zusammenfassend besaßen die einzelnen Regionen TR6 und TR10 ein gegenüber der PCR-Ribotypisierung geringeres Diskriminierungsvermögen. Dahingegen führte die Kombination der beiden Regionen zu einem Anstieg der Diskriminierungsfähigkeit auf ein Niveau ähnlich dem des Standardtypisierverfahrens für *C. difficile* (Tab. 3.5). Über die Analyse der verknüpften TR6 und TR10 Sequenzen konnten insgesamt 72 unterschiedliche Sequenztypen unter den 154 untersuchten Isolaten identifiziert werden, was zur Etablierung eines neuen Typisierverfahrens für *C. difficile* führte.

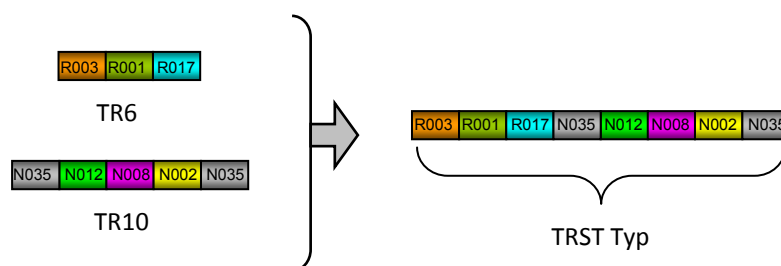
### 3.2.3 Etablierung der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST)

Die kombinierte DNA-Sequenzanalyse der beiden vergleichsweise schnell evolvierenden, repetitiven Regionen TR6 und TR10 führte zur Etablierung eines neuen Typisierverfahrens für *C. difficile*, der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST) (Zaiß *et al.*, 2009). Zur Erleichterung der Anwendung ist eine Duplex-PCR entwickelt worden, welche die simultane Amplifizierung beider Regionen und anschließende Sequenzierung der Produkte aus dem PCR-Ansatz mit identischen Primern erlaubt (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Duplex-PCR zur simultanen Amplifizierung der Regionen TR6 und TR10 aus *C. difficile* Isolaten unterschiedlicher Ribotypen. Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung zum Nachweis der Amplikons. Spur M: Molekulargewichtsstandard 100 bp DNA Ladder, extended (Roth, Karlsruhe); Isolate (Ribotypen): VPI10463 (087), 630 (012), NCTC 13366 (027), TR13 (005), N485 (042), SMI055 (066), NCTC 11204 (001), FR535 (150), FR505 (032); Spur N: Negativkontrolle.

Die Nukleotidsequenzen beider Regionen wurden konkateniert und der Sequenzpolymorphismus der Wiederholungsmotive ermittelt. Die verschiedenen Allele der Wiederholungseinheiten sind alphanumerisch benannt worden und aus der Abfolge der Allele von TR6 und TR10 konnten entsprechende TRST-Sequenztypen (Präfix „tr“) abgeleitet werden (Abb. 3.5, Tab. A3-5).



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung - TRST. Die Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 werden mittels einer Duplex-PCR gemeinsam amplifiziert und nach erfolgter Sequenzierung den Wiederholungsmotiven spezifische Allele zugewiesen. Die Abfolge der Allele beider Wiederholungssequenzen entspricht einem bestimmten TRST-Sequenztyp.

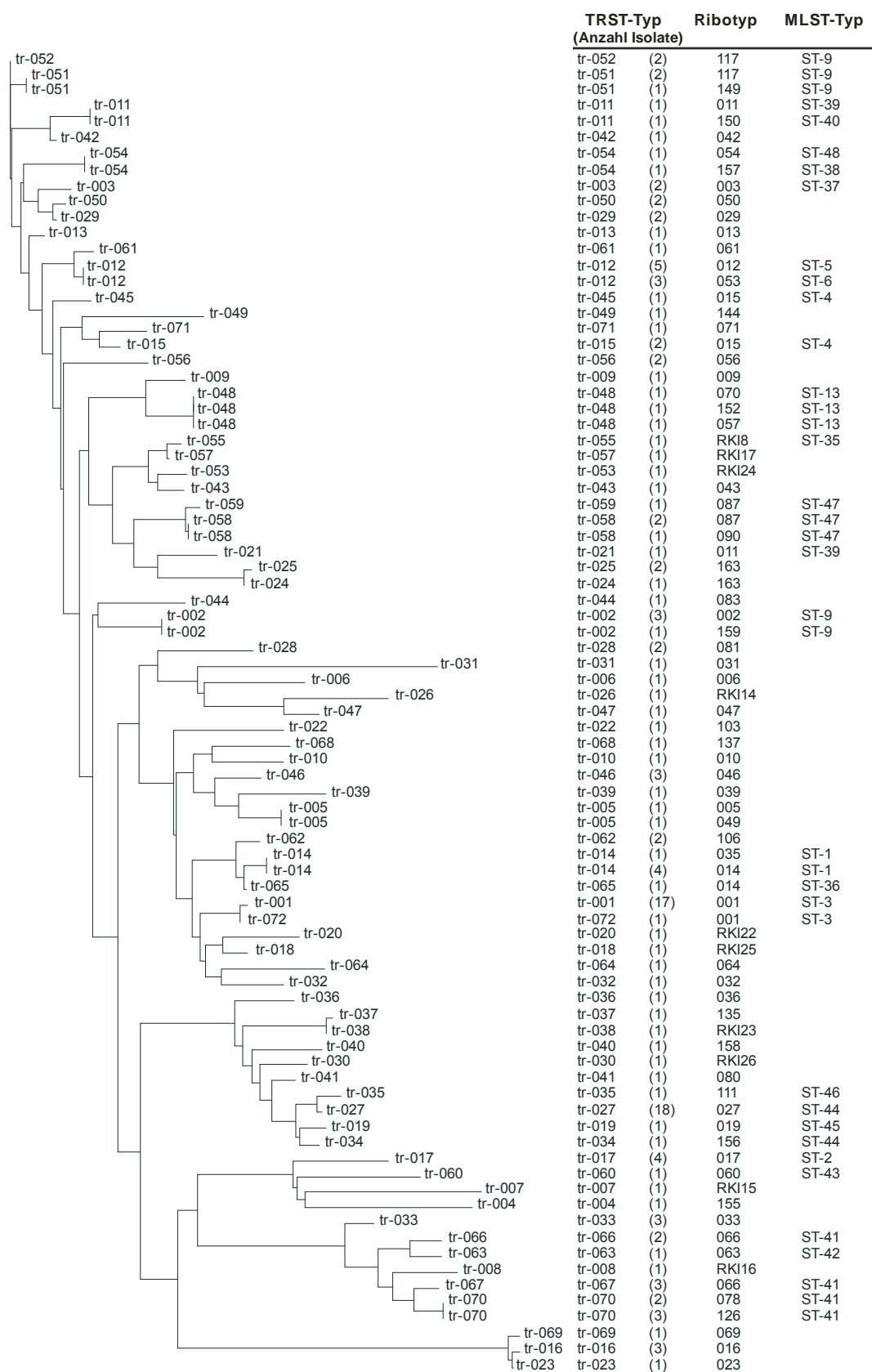
Insgesamt konnten auf diese Weise innerhalb der 154 untersuchten Isolate 72 Sequenztypen identifiziert werden (tr-001 bis tr-072, Tab. A3, A6), was einem im Vergleich zur Ribotypisierung identischen Diskriminatorischen Index von 0,97 entsprach (Tab. 3.5). Um Fehler bei der Sequenzbearbeitung der konkatenierten Regionen zu minimieren, wurde in Zusammenarbeit mit Applied Maths ein neue Anwendung für das Datenbanksystem BioNumerics v6.0 entwickelt, das so genannte „*Polymorphic VNTR typing Plugin*“. Diese Anwendung ermöglichte die automatische Identifizierung Benutzer-definierter Wiederholungsallele innerhalb einer eingeladen Sequenz und die Berechnung einer Distanzmatrix der verschiedenen Allelabfolgen basierend auf dem DSI-Model, ein Mutationsmodell für Wiederholungssequenzen, welches neben der Möglichkeit von Substitutionen, Insertionen oder Deletionen (Indels) auch die Möglichkeit von Duplikation von DNA-Fragmenten mit einschließt. Abbildung 3.6 zeigt eine phylogenetische Clusteranalyse der 72 identifizierten Sequenztypen basierend auf der Distanzmatrix der Wiederholungsmotive konkatenierter TR6 und TR10 Sequenzen und dem *Neighbor Joining* Algorithmus. Im folgenden Abschnitt werden auf die Übereinstimmungen und Unterschiede der TRST im Vergleich zur PCR-Ribotypisierung eingegangen und die phylogenetischen Beziehungen der einzelnen TRST-Sequenztypen näher beleuchtet.

### 3.2.4 Konkordanz der TRST zur PCR-Ribotypisierung

Die TRST und PCR-Ribotypisierung wiesen nicht nur ein ähnliches Diskriminierungsvermögen auf, sondern zeigten auch eine hohe Übereinstimmung in der Art und Weise der Typzuweisung. Während für die einzelnen Wiederholungssequenzen noch eine geringe Konkordanz zur Ribotypisierung von 60 % für TR6 bzw. 72 % für TR10 ermittelt werden konnte, wies TRST eine Gesamtkonkordanz für die Anzahl untersuchter Stämme von 89,8 % (bereinigter Rand Index) auf (Tab. 3.5). Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unabhängige Isolate mit identischem Ribotyp ebenso einem identischen TRST-Sequenztyp entsprechen würden, betrug 89,6 % (Wallace Index).

So konnte innerhalb der untersuchten Stammsammlung den meisten PCR-Ribotypen auch ein spezifischer TRST-Sequenztyp zugewiesen werden (Abb. 3.6, Tab. A6). Zum Beispiel entsprachen 18 Isolate des Ribotyps 027 aus sechs unterschiedlichen europäischen Ländern durch identische Sequenzen in beiden Wiederholungsregionen dem Sequenztyp tr-027 und wurden von allen bisher untersuchten Isolaten mit unterschiedlichem Ribotyp diskriminiert (Abb. 3.6, Tab. A6). Des Weiteren wiesen vier Toxin A-negative, Toxin B-positive Isolate des Ribotyps 017 aus drei verschiedenen Ländern den Sequenztyp tr-017 auf, was dafür spricht, dass epidemiologisch relevante Stämme mit Hilfe der TRST diskriminiert werden können (Abb. 3.6, Tab. A6).

In einigen Fällen konnten Abweichungen in der Art der Diskriminierung zwischen der TRST und PCR-Ribotypisierung beobachtet werden, wo entweder Isolate eines Ribotyps weiter diskriminiert oder verschiedene Ribotypen zu einem Sequenztyp zusammengefasst wurden. Um zu untersuchen, inwieweit diese Unterschiede der Phylogenie des Erregers entsprechen, wurden ausgewählte Isolate mit Hilfe der Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) analysiert.



**Abb. 3.6:** Phylogenetische Analyse (*Neighbor Joining*) basierend auf der Abfolge der Wiederholungsmotive konkatenierter TR6 und TR10 Sequenzen von 154 *C. difficile* Isolaten. Die Distanzmatrix der Allelabfolgen wurde anhand des DSI-Modells berechnet, ein Mutationsmodell welches sowohl Substitutionen, Insertionen oder Deletionen (Indels) als auch die Möglichkeit von Duplikation von Wiederholungseinheiten mit einschließt. Neben dem TRST-Typ ist der entsprechende PCR-Ribotyp und MLST-Sequenztyp ausgewählter Isolate angezeigt.

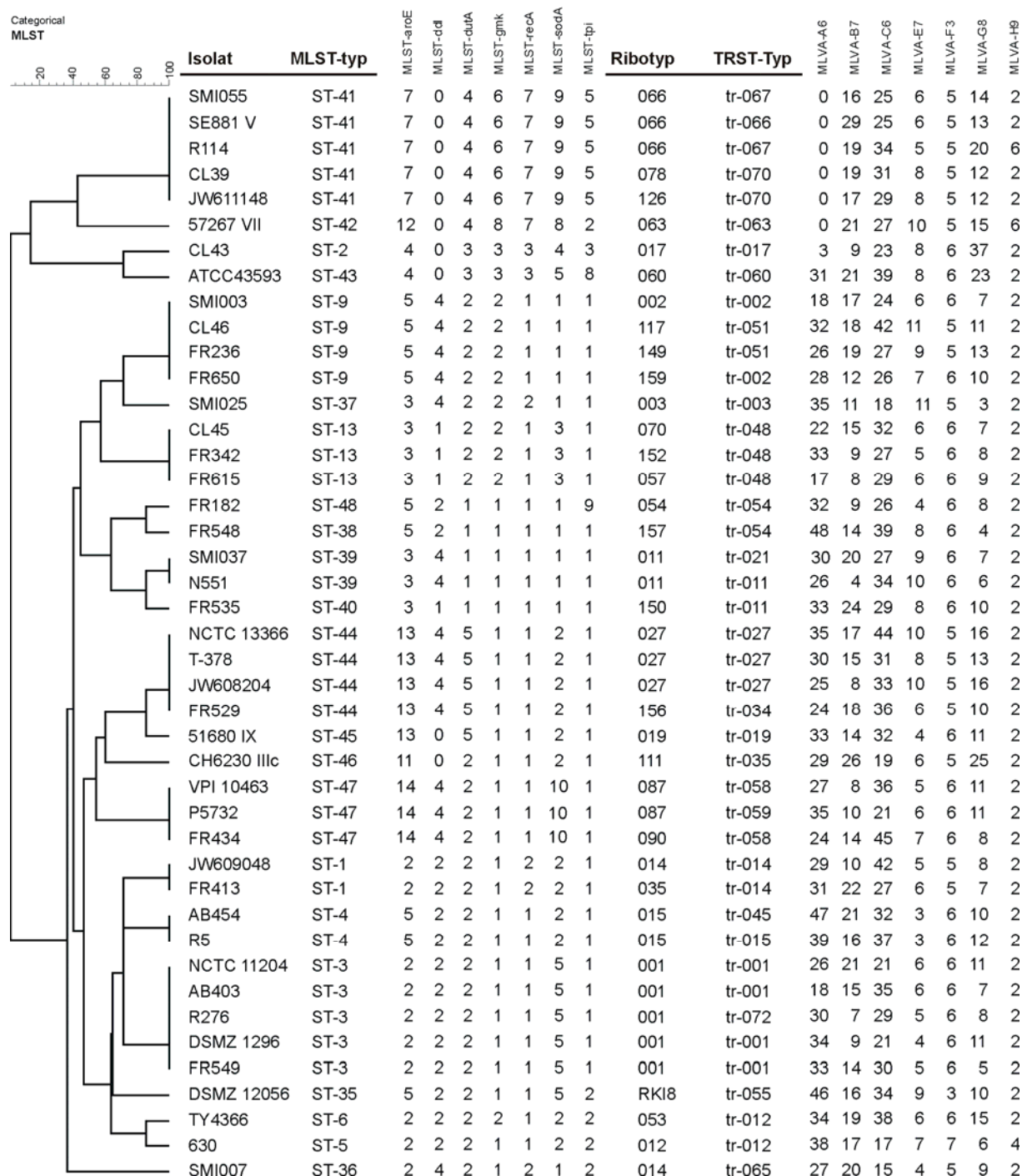
### 3.2.5 Konkordanz der TRST zur MLST

Die MLST beruht auf der Analyse der Sequenzdiversität neutral evolvierender Haushaltsgene, zuverlässiger phylogenetischer Marker, deren Diversität zur Aufklärung der Populationsstruktur zahlreicher bakterieller Erreger Verwendung fand (Enright *et al.*, 2000; Maiden, 2006). In den Fällen, in denen Isolate verschiedener Ribotypen einen identischen TRST-Sequenztyp aufwiesen, wurden ebenso identische MLST-Sequenztypen oder Einzellokusvarianten der MLST (identische Sequenzen in sechs von sieben Haushaltsgenen) nachgewiesen, welches die enge genetische Verwandtschaft dieser Isolate anzeigt (Abb. 3.7). So sind zum Beispiel Isolate der Ribotypen 070, 152 und 057 neben dem identischen TRST-Sequenztyp tr-048 ebenfalls durch den gemeinsamen MLST-Sequenztyp ST-13 klassifiziert worden oder Isolate der Ribotypen 117 und 149 wiesen außer dem TRST-Typ tr-051 auch den MLST-Typ ST-9 auf (Abb. 3.7).

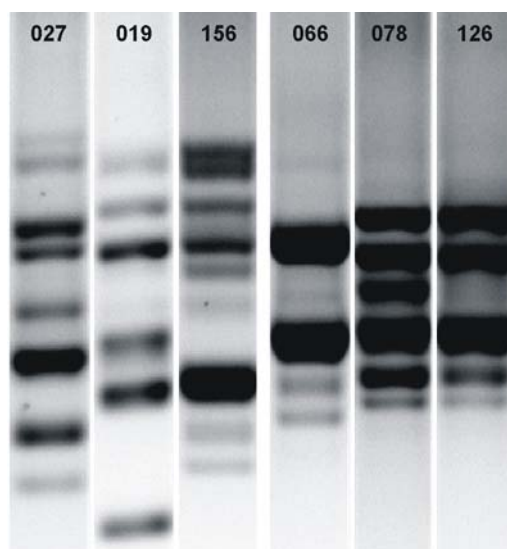
Aufgrund der hohen Konkordanz zur MLST (Rand Index = 0,96) war es an sich möglich, über den Sequenzvergleich der beiden TRST-Regionen und anschließender Clusteranalysen die Phylogenie von *C. difficile* korrekt abzubilden. So wurden die Ribotypen 027, 156 und 019 basierend auf der MLST durch einen hohen Verwandtschaftsgrad gekennzeichnet; entsprechende Isolate wiesen den Sequenztyp ST-44 (Ribotyp 027 und 159) bzw. die Einzellokusvariante ST-45 auf (Ribotyp 019, Abb. 3.7). Analog konnten Isolate dieser Ribotypen auch durch verwandte Sequenzen in den Wiederholungsregionen der TRST charakterisiert werden, welche zusammen im phylogenetischen Dendrogramm gruppiert wurden (Abb. 3.6). Dahingegen war es anhand der stark unterschiedlichen Bandenmuster der PCR-Ribotypisierung nicht möglich, auf Verwandtschaftsverhältnisse dieser Isolate zu schließen (Abb. 3.8). In ähnlicher Weise wurden auch die Ribotypen 078, 126 und 066 in der MLST und TRST Analyse durch eine enge Verwandtschaft gekennzeichnet, wohingegen die Bandenmuster der Ribotypisierung zum Teil stark variierten (Abb. 3.8).

Die phylogenetische Beziehung zwischen Isolaten ging ebenso in den Fällen nicht verloren, in denen die TRST ein stärkeres Diskriminierungsvermögen als die PCR-Ribotypisierung und MLST aufwies. Zum Beispiel konnten Isolate der Ribotypen 001, 087 und 117 in mehrere TRST-Subtypen unterdifferenziert werden (Abb. 3.6, Tab. A6). Cluster der TRST-Wiederholungssequenzen dieser Subtypen korrelierten aber immer noch im phylogenetischen Baum mit dem entsprechenden Ribotyp und MLST-Typ, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Typisierungsmethoden gewährleistet (Abb. 3.6). Um die phylogenetischen Zusammenhänge von TRST-Sequenztypen auch innerhalb eines MLST-Typs genauer untersuchen zu

können, wurden die Isolate zusätzlich mit der *Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) typisiert.



**Abb. 3.7:** Clusteranalyse (UPGMA) basierend auf den MLST-Allelprofilen von 43 *C. difficile* Isolaten. Dargestellt sind neben dem PCR-Ribotyp, MLST- und TRST-Sequenztyp die MLST-Allelprofile der sieben Haushaltsgene sowie die auf der Kopiezahl von sieben Wiederholungsregionen beruhenden MLVA-Profile.



**Abb. 3.8:** Bandenmuster der PCR-Ribotypisierung in der Agarosegelelektrophorese. Dargestellt sind die Muster der Ribotypen 027 (Isolat NCTC 13366), 019 (51680), 156 (FR529), 066 (SE881), 078 (CL39) und 126 (JW611148).

### 3.2.6 Subdifferenzierung ausgewählter Isolate mit Hilfe der MLVA

Die MLVA beruht auf der Analyse der Längenpolymorphismen von sieben auf dem Genom verteilten VNTR (engl. *variable-number tandem repeat*) Regionen, Regionen mit sehr kleinen Wiederholungseinheiten < 10 bp, die sehr schnell aufgrund intramolekularer Rekombinationsereignisse evolvieren. Damit ist die MLVA aufgrund eines sehr hohen Diskriminierungsvermögens in der Lage, Isolate eines MLST-, Ribo- oder auch TRST-Typs weiter zu diskriminieren (Killgore *et al.*, 2008).

Die Unterdifferenzierung von Isolaten mittels der MLVA lieferte in unserer Stammsammlung allerdings nur wenige Einblicke in die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Stämme, da sich fast alle Isolate in mindestens vier VNTR-Regionen voneinander unterschieden, selbst wenn diese durch identische MLST-Sequenztypen, PCR-Ribotypen oder TRST-Sequenztypen klassifiziert worden sind (Abb. 3.7). Die einzige Ausnahme bildeten zwei Isolate aus Stuttgart (JW611148) und Tübingen (CL39), die identische Allele in fünf von sieben VNTR Regionen aufwiesen. Die Summe der Unterschiede in der Kopiezahl der Wiederholungseinheiten der sieben VNTR-Regionen (engl. *summed tandem repeat difference* – STRD) zwischen den beiden Isolaten betrug vier Wiederholungseinheiten, was unter dem Grenzwert einer STRD von  $\leq 10$  liegt, der als genetisch nah verwandt definiert wurde (Marsh *et al.*, 2006). Die nahe Verwandtschaft der beiden Isolate wurde durch den identischen MLST Sequenztyp ST-41 bestä-



tigt, und beide Isolate wiesen ebenso identische Sequenzen in den TRST Regionen TR6 und TR10 auf (tr-070, Abb. 3.7), was die Konkordanz der TRST zur MLST unterstreicht. In der PCR-Ribotypisierung wiesen die Amplifikatmuster der beiden Isolate im Agarosegel ebenfalls Ähnlichkeiten auf, unterschieden sich aber deutlich in einer Bande und die Muster entsprachen so den unterschiedlichen Ribotypen 078 (CL39) und 126 (JW611148) (Abb. 3.8).

Zwei weitere Paare von Isolaten zeigten ebenfalls ähnliche MLVA-Profile, die sich nur in zwei Allelen voneinander unterschieden, welches eine phylogenetische Beziehung der entsprechenden Isolate suggeriert (AB403/CL45 bzw. NCTC11204/P5732; Abb. 3.7). Diese scheinbare Verwandtschaft der Isolate ist aber auf die zufällige, konvergente Evolution identischer Kopiezahlen in den MLVA Regionen zurückzuführen (Homoplasie), da sich die Isolate jeweils in mindestens drei Sequenzen der im Rahmen der MLST untersuchten, neutral evolvierenden Haushaltsgene unterschieden (Abb. 3.7). Die Ergebnisse deuten entsprechend darauf hin, dass durch die schnelle Evolution der VNTR Regionen und damit der Gefahr zufälliger Ähnlichkeiten durch Homoplasie und Allelsättigung das gegenwärtig verwendete MLVA-Schema ungeeignet ist, um phylogenetische Beziehungen von Isolaten korrekt abzubilden, die über größere Zeiträume gesammelt in keinem direkten epidemiologischen Zusammenhang stehen. Die genauen phylogenetischen Zusammenhänge im Fall einer Subdifferenzierung eines MLST-Sequenztyps durch die Ribotypisierung oder TRST bleiben entsprechend solange unklar, bis zusätzliche phylogenetische Marker vorliegen, welche eine verlässliche Untersuchung der evolutionären Geschichte von *C. difficile* auch innerhalb eines MLST-Sequenztyps erlauben.

### 3.2.7 Evolution der TRST Wiederholungssequenzen

Um den Einfluss von positiver Selektion auf die Evolution der TRST Wiederholungssequenzen ausschließen zu können, wurde das normalisierte Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Mutationen ( $K_a/K_s$ ) ermittelt. Die Mehrheit der Nukleotidsubstitutionen der Region TR6 war synonym, was sich in einem  $K_a/K_s$ -Verhältnis von 0,39 ausdrückte und dafür spricht, dass die Region TR6 unter stabilisierender Selektion evolviert. Die Region TR10 lag in einem nicht-kodierenden Bereich was eine neutrale Selektion indiziert. Entsprechend ist davon auszugehen, dass die beiden Regionen keinem positiven Selektionsdruck unterliegen und neutral evolvieren. In drei Fällen gab es Hinweise auf Rekombination zwischen Chromosomen verschiedener Stämme, welche die Sequenz der repetitiven Regionen beeinflusst haben könnte. So ist der TRST-Sequenztyp tr-021 offenbar als Folge eines homologen Rekombina-

tionsereignisses entstanden. Isolate des Typs tr-021 (Isolat SMI037) und tr-011 (N551) wiesen nicht nur einen identischen MLST-Sequenztyp (ST-39) sondern auch PCR-Ribotyp (011) auf, was auf die enge Phylogenie der Isolate hindeutet (Abb. 3.7). Beide Isolate besaßen auch eine identische Wiederholungssequenz im TRST-Marker TR6, wohingegen die Sequenzen der Region TR10 beider Typen erheblich voneinander abwichen, sowohl was die Kopiezahl als auch die Allelabfolge der Wiederholungseinheiten betraf (Tab. A3). Die TR10 Sequenz des Typs tr-021 war stattdessen identisch zur Sequenz des Typs tr-005, mit dem kein weiterer phylogenetischer Zusammenhang bestand, weshalb die starken Sequenzunterschiede zwischen tr-021 und tr-011 in Region TR10 durch den horizontalen Gentransfer zweier nicht verwandter Stämme erklärt werden könnten (Tab. A3).

Eine ähnliche Situation war bei den Sequenztypen tr-066 und tr-045 zu beobachten, die wieder identische TR6 bzw. TR10 Allele mit basierend auf den Ergebnissen der MLST nah verwandten TRST-Typen aufwiesen, sich aber in zentralen Abschnitten der anderen Tandemwiederholungssequenz drastisch unterschieden (Tab. A3). Wieder konnten identische Allele in anderen Typen nachgewiesen werden, was für einen horizontalen Austausch dieser Regionen spricht.

Solche Diskrepanzen zwischen den repetitiven Regionen nah verwandter Stämme konnten nur in diesen drei Ausnahmen festgestellt werden, weshalb darauf geschlossen werden kann, dass genetische Rekombination bei der Evolution von maximal drei von insgesamt 72 unterschiedlichen TRST-Sequenztypen, die in unserer Stammsammlung vertreten waren, eine Rolle gespielt hat. Dies zeigt, dass die Evolution der Regionen TR6 und TR10 hauptsächlich über die klonale Diversifizierung durch Mutationen erfolgt und dass der Einfluss von Rekombination als gering anzusehen ist. Damit bestätigten diese Ergebnisse die Annahme einer sehr klonalen Populationsstruktur von *C. difficile* (Lemee *et al.*, 2004) und deuten darauf hin, dass die Stabilität der Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 trotz der ausgeprägten Sequenzdiversität ausreichend ist, um auch genetische Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Isolaten aufzeigen zu können, die über längere Zeiträume gesammelt worden sind. Die Stabilität der beiden Wiederholungssequenzen konnte weiterhin durch zwei *C. difficile* VPI 10463 und drei *C. difficile* 630 Stämme (einschließlich der publizierten Genomsequenz) demonstriert werden, die vor unseren Analysen aus unterschiedlichen internationalen Laboren stammend über längere Zeiträume unabhängig voneinander kultiviert worden sind und dennoch identische TRST-Sequenztypen aufwiesen (Tab. A6). Identische TRST-Sequenzen konnten ebenfalls in internationalen Isolaten eines Ribotyps nachgewiesen werden, wodurch die Eignung von TRST auch

für langfristig angelegte, globale epidemiologische Studien und Surveillance-Programme gezeigt werden konnte.

### **3.3 Mikroevolution und Phylogeographie des *C. difficile* Ribotyps 027**

Die Inzidenz von *C. difficile* Infektionen ist in den letzten Jahren weltweit gestiegen, zum Teil assoziiert mit der Ausbreitung hoch virulenter Epidemiestämme des Ribotyps 027 (Kuijper *et al.*, 2006a). Trotz des globalen Auftretens und der stetigen Ausbreitung dieses Epidemiestammes konnten bisher weder die Entstehungsgeschichte noch die Kräfte, die eine weitere Verbreitung des Ribotyps fördern, ausreichend aufgeklärt werden. Zur Rekonstruktion der Mikroevolution und phylogeographischen Verbreitung des Ribotyps 027 wurde die Sequenzdiversität in neutral evolvierenden Haushaltsgenen innerhalb einer internationalen Stammsammlung historischer und aktueller Isolate ermittelt. Zusätzlich wurde das Genom eines in Norddeutschland asservierten Typ 027 Isolats sequenziert und mit bereits publizierten Genomsequenzen verglichen. Da aufgrund der schnellen Evolution intergenetischer Wiederholungssequenzen die MLVA über eine hohe Diskriminierungsfähigkeit verfügt und Cluster von Infektionen auch innerhalb eines Ribotyps aufklären kann, sind die Isolate außerdem mit der MLVA typisiert worden.

#### **3.3.1 Genomweite Mutationsanalysen zur Aufklärung der genetischen Populationsstruktur des *C. difficile* Ribotyps 027**

Zur Rekonstruktion der Phylogenie und evolutionären Geschichte des *C. difficile* Ribotyps 027 wurde die Sequenzdiversität in 300 Haushaltsgenen innerhalb einer internationalen Stammsammlung von 60 Isolaten analysiert. Die 300 Gene wurden anhand des vollständig sequenzierten und annotierten Genoms des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählt und gehörten ausschließlich dem Intermediär-, Energie-, Fettsäure-, Nukleotid-, Aminosäure- und Makromolekülmetabolismus an (Sebaihia *et al.*, 2006). Um eine möglichst homogene Abdeckung des *C. difficile* Genoms gewährleisten zu können, wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Gene über das gesamte Chromosom geachtet. Weiterhin waren Gene in unmittelbarer Nähe zu mobilen genetischen Elementen oder Virulenz-assoziierten Markern aus dem Datensatz zu entfernen, um den Einfluss positiver Selektion über eine genetische Kopplung ausschließen zu

können. Für die 300 Gene wurden Oligonukleotid-Primer zur PCR-Amplifizierung entworfen und Unterschiede der amplifizierten DNA-Fragmente gegenüber dem Referenzstamm P5433 mittels der Schmelzkurvenanalyse der dHPLC detektiert. Die Verifizierung der Polymorphismen erfolgte über eine anschließende Sequenzierung. Siebzehn Gene ließen sich nicht aus allen 60 Isolaten des Ribotyps 027 amplifizieren und wurden so nachträglich aus dem Datensatz entfernt. Die 283 verbliebenen Gene lieferten Sequenzinformation über 127 kb, was einer Abdeckung von ungefähr 3 % des 4,3 Mb großen *C. difficile* Genoms entsprach (Tab. A7).

Die internationale Stammsammlung bestand aus 60 Isolaten aus sieben unterschiedlichen Ländern, die zwischen 1990 und 2008 asserviert worden sind (Tab A8). Alle Isolate wurden mittels der PCR-Ribotypisierung und TRST molekular typisiert und bezüglich charakteristischer Erregereigenschaften einschließlich beider Gene *cdtA* und *cdtB* des binären Toxins, der sinnentstellenden Deletion an Position 117 und 18 bp Deletion im Gen des Toxinrepressors TcdC analysiert. Die TRST bewies wieder eine hohe Konkordanz zur PCR-Ribotypisierung und nahezu alle Isolate zeigten identische Allelabfolgen in beiden TRST-Wiederholungssequenzen (TSRT-Typ tr-027), mit der Ausnahme von einem Isolat aus den USA (USA 8), welches durch die Deletion einer Wiederholungseinheit in Region TR6 subdifferenziert wurde (TSRT-Typ tr-076 – Tab. A3). Die charakteristischen Gene des binären Toxins und *tcdC* Allele konnten ubiquitär in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden (Tab. A8).

Entgegen allen Erwartungen zeigte die Sequenzanalyse über 127 kb innerhalb der globalen Stammsammlung von 60 Isolaten, die von drei unterschiedlichen Kontinenten stammend eine Zeitspanne von 18 Jahren umschlossen, nur einen einzigen Polymorphismus auf, eine nicht-synonyme Substitution (C-841→T; Asp-281→Asn) innerhalb eines hypothetischen Eisenschwefelproteins (ORF CD1525 des *C. difficile* 630 Genoms) in zwei Isolaten aus Oklahoma und Arizona (USA 2, 3 – Tab. A8).

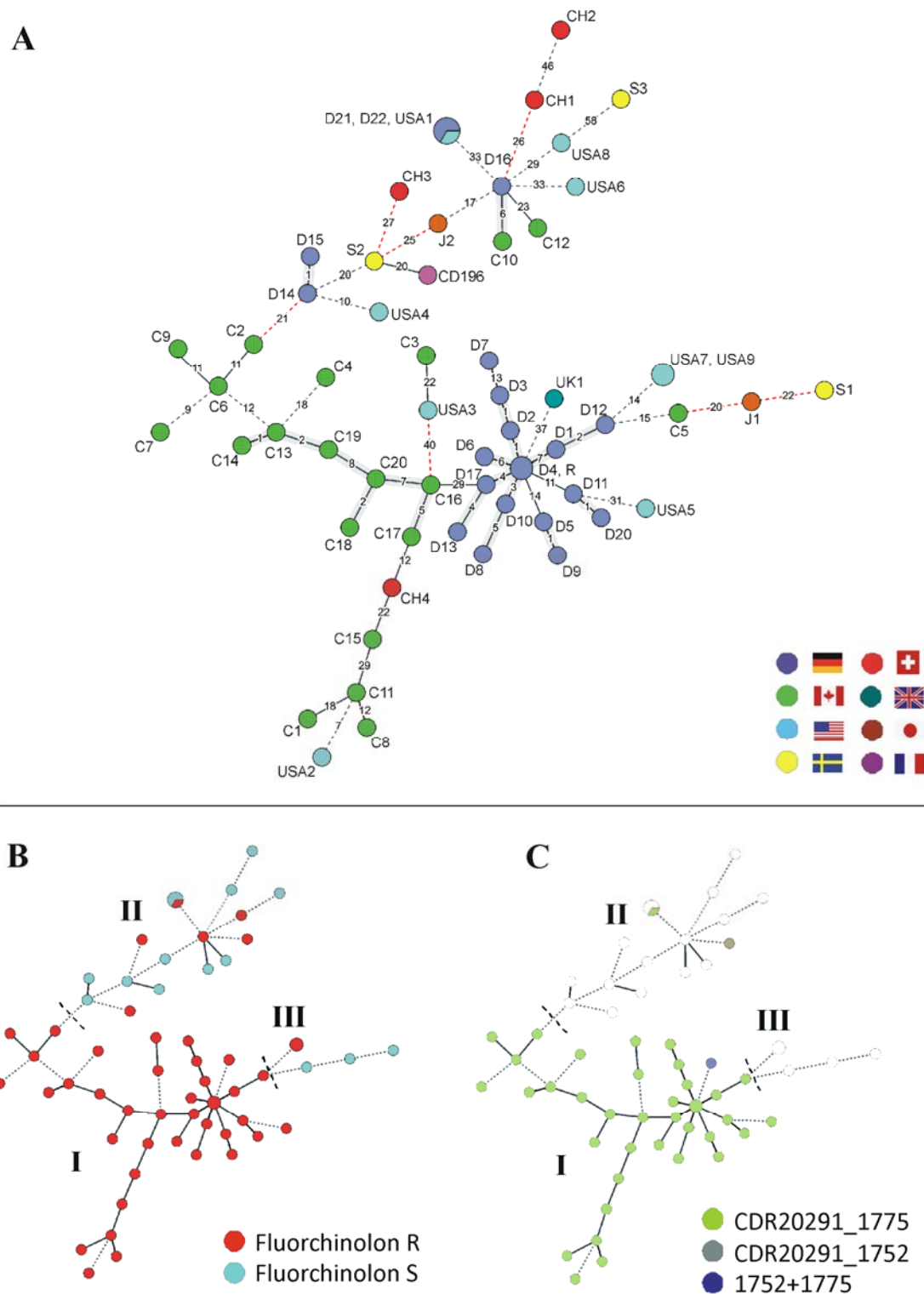
Die daraus abgeleitete Nukleotiddiversität ( $\pi$ ), also die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte homologe Nukleotide unterschiedlich sind, betrug  $1,3 \times 10^{-7}$ , ein Wert, der eine extrem geringe Diversität widerspiegelt. Beispielsweise konnte in einer ähnlichen Studie zur evolutionären Populationsstruktur des klonalen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) des MLST-Sequenztyps 225 eine 80mal höhere Diversität von  $1 \times 10^{-5}$  ermittelt werden (Nübel *et al.*, 2010). Aufgrund dieser geringen Diversität des Kerngenoms von *C. difficile* sind Rückschlüsse zur evolutionärgeschichtlichen Entwicklung des Ribotyps 027 anhand der durchgeführten Mutationsanalyse nicht möglich.

### 3.3.2 Korrelation der MLVA Cluster mit Fluorchinolonresistenz und Gengehalt

Um trotz der geringen Diversität des Kerngenoms von *C. difficile* einen ersten Einblick in die Mikroevolution des Ribotyps 027 erlangen zu können, wurden die 60 Isolate mit Hilfe der MLVA genotypisiert. Zusätzlich konnte aus der Genomsequenz des 1985 isolierten, französischen Stammes CD196 das MLVA-Profil abgeleitet werden (Popoff *et al.*, 1988; Stabler *et al.*, 2009) (Tab. A9).

Ein *Minimum-Spanning-Tree* (MST) basierend auf den MLVA-Profilen der 61 Isolate ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Clustersignifikanz wurde durch eine Permutationsanalyse mit 1000 Wiederholungen ermittelt. Um neu entstandene Varianten des Ribotyps 027 von historischen, aber teilweise noch prävalenten Genotypen des Ribotyps unterscheiden zu können, wurden alle Isolate auf Fluorchinolonresistenz untersucht, einem phänotypischen Marker, dessen Verbreitung sich mit der steigenden Inzidenz epidemischer Typ 027 Isolate deckt und nicht in historischen Stämmen nachgewiesen wurde (Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005). Alle resistenten Stämme zeigten Resistenzlevel  $> 32$  mg/l für Moxifloxacin und Levofloxacin in der E-Test Bestimmung, alle sensiblen MHK-Werte  $< 0,5$  mg/l. Da die Fluorchinolonresistenz mit Mutationen im aktiven Zentrum der DNA-Gyrase assoziiert ist, wurde die Resistenz-determinierende Region beider Untereinheiten GyrA und GyrB in allen 61 Isolaten charakterisiert (Ackermann *et al.*, 2001; Dridi *et al.*, 2002; Spigaglia *et al.*, 2008). Alle resistenten Isolate wiesen die identische Transitionsmutation (ACT zu ATT) in *gyrA* auf, welche in der Aminosäuresubstitution Thr-82→Ile resultiert und in zahlreichen Studien mit Fluorchinolonresistenz in *C. difficile* assoziiert wurde (Tab. A8) (Ackermann *et al.*, 2001; Dridi *et al.*, 2002; Spigaglia *et al.*, 2008). Ein Isolat aus New York (USA 4) zeigte eine zusätzliche Ala-118→Ser Substitution (GCT zu TCT) und zwei Isolate wiesen außerdem eine ebenfalls beschriebene Asp-426→Asn Mutation in *gyrB* (GAT zu AAT) auf (C8, C11) (Walkty *et al.*, 2010). Dahingegen konnte in sensiblen Isolaten keine Mutation in den Untereinheiten der Gyrase nachgewiesen werden (Tab. A8).

Basierend auf der Verteilung der Fluorchinolonresistenz ließen sich im MLVA-MST drei große Bereiche unterscheiden (Abb. 3.9 - B). Resistente Stämme wurden vor allem Cluster I zugeordnet, wohingegen sensible Isolate ausschließlich in den Linien II und III auftraten ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 3.9:** Minimum Spanning Dendrogramm basierend auf den MLVA-Profilen von 61 *C. difficile* Ribotyp 027 Isolaten. Detaillierte Informationen zu den Stämmen und MLVA-Profilen befinden sich in Tab. A8-9. Die Clustersignifikanz wurde durch eine Permutationsanalyse mit 1000 Wiederholungen ermittelt. **A:** Farbige Darstellung der geographischen Herkunft mit Angabe der STRD (durchgehende kurze Linie = Einzellokusvariante; durchgehende lange Linie = Doppelokusvariante; gestrichelte Linie > 2 unterschiedliche MLVA-Regionen; grau hinterlegte Linie = STRD < 10; rote Linie = Clustersignifikanz < 80 %). **B:** Verteilung der Fluorchinolonresistenz mit Clustereinteilung (I-III). **C:** Verteilung der Marker CDR20291\_1775 & 1752 mit Clustereinteilung (I-III).

Da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass Gyrase Mutationen und assoziierte Resistenz leicht durch subinhibitorische Fluorchinolone Konzentrationen selektiert werden (Deneve *et al.*, 2009; Saxton *et al.*, 2009), ist davon auszugehen, dass die Resistenz in den Linien II und III als konvergente Entwicklung mehrfach unabhängig als Folge eines adaptiven Selektionsdrucks entstanden ist.

Zusätzlich zur Fluorchinolone Resistenz wurde weiterhin die Verbreitung von zwei Genen analysiert, die durch vergleichende Genomanalysen des aktuellen englischen Stammes R20291 von 2006 und französischen Stammes CD196 von 1985 als spezifisch für das konjugative Transposon CTnCD5b des englischen Ausbruchstammes definiert worden sind (He *et al.*, 2010; Stabler *et al.*, 2009). Diese Gene, einschließlich eines hypothetischen ABC-Transporters für Lantibiotika (CDR20291\_1752) und eines putativen Regulationsproteins eines Zweikomponentensystems (CDR20291\_1775) waren ebenfalls hoch prävalent in aktuellen Ribotyp 027 Stämmen, die zwischen 2001 und 2004 in den USA gesammelt wurden, wohingegen in historischen amerikanischen Isolat von 1988 bis 1995 kein Nachweis erfolgte (Stabler *et al.*, 2009).

Der hypothetische ABC-Transporter war in unserem Datensatz von geringer epidemiologischer Bedeutung, da dieser weder in aktuellen deutschen noch kanadischen Isolat nachgewiesen werden konnte und neben dem englischen Ausbruchstamm R20291 nur ein Isolat aus Ohio (USA 6) den Marker aufwies (Abb. 3.9 - C). Dahingegen korrelierte die Verteilung des putativen Regulationsproteins CDR20291\_1775 mit der Fluorchinolone Resistenz (Abb. 3.9 – B, C). Wieder konnte in allen Stämmen des Clusters I das Gen nachgewiesen werden, wohingegen Stämme der Linien II und III, mit der Ausnahme des Isolats USA1, den Regulator nicht aufwiesen. Das Fehlen des Regulators auch in Fluorchinolone resistenten Isolat der Linien II und III ist wieder ein Zeichen für die höchst wahrscheinlich konvergente Evolution der Resistenz in diesen Fällen. Im Falle des Isolats USA1 wäre sowohl ein horizontaler Transfer des konjugativen Transposons bei konvergenter Resistenzentwicklung als auch eine Fehlgruppierung bedingt durch die homoplastische Bildung identischer MLVA-Allele denkbar.

### 3.3.3 Hohes Homoplasielevel der MLVA

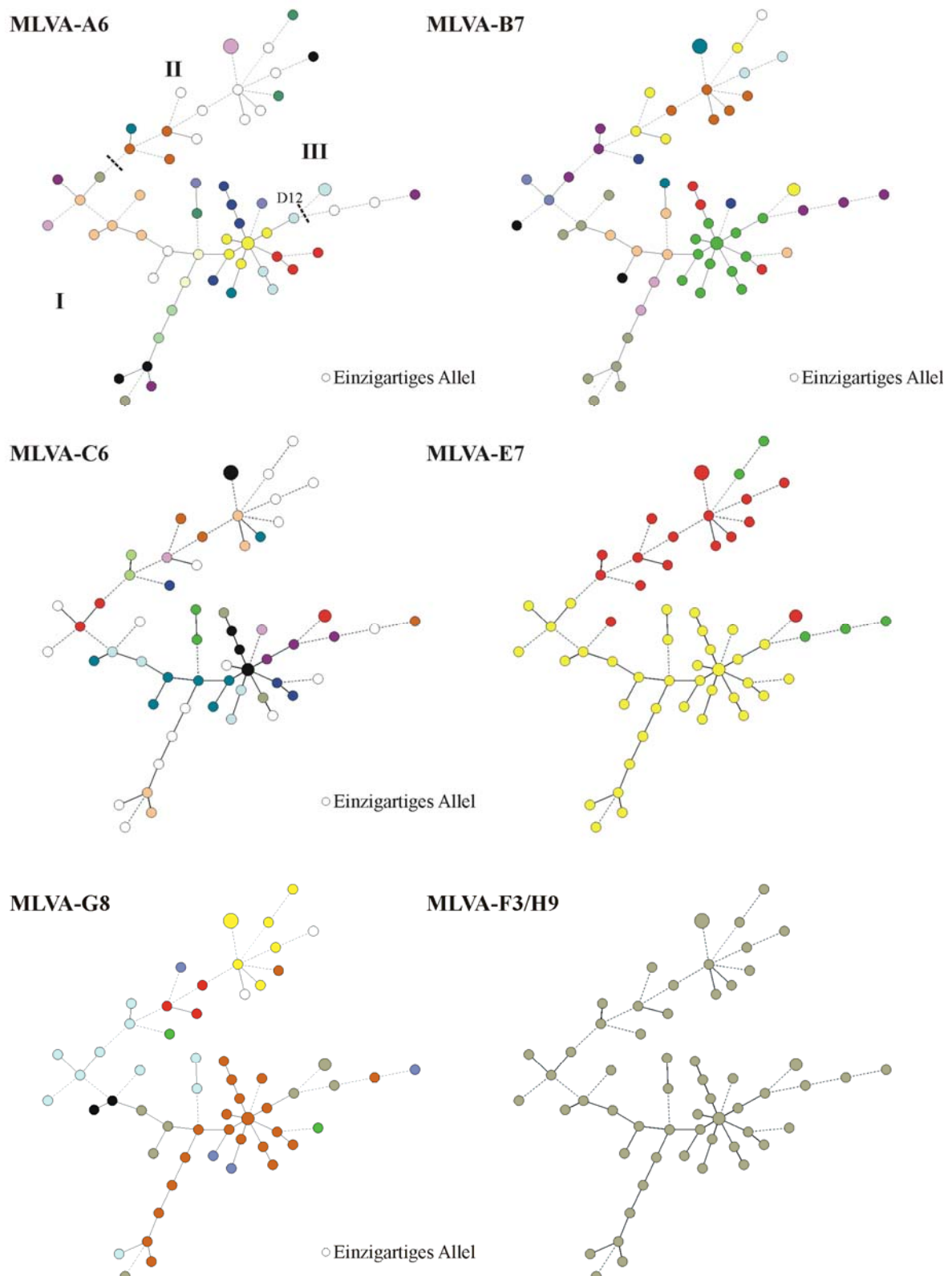
Die korrekte Phylogenie weit divergenter Linien mit Hilfe der MLVA abzuleiten ist schwierig, da es aufgrund der schnellen Evolution einiger Wiederholungssequenzen und einer begrenzten Anzahl maximal verfügbarer Allele zu unabhängigen, konvergent entstandenen Ähn-

lichkeiten in MLVA-Profilen kommen kann (Homoplasie), welche in der falschen Gruppierung von Isolaten resultieren (Fawley *et al.*, 2008; Zaiß *et al.*, 2009). In unserem Datensatz war das Homoplasielevel sehr hoch (Homoplasie Index = 0,319; Retention Index = 0,738), was zu einer relativ variablen Phylogenie führte (Abb. 3.10).

Zum Beispiel konnte durch die Verteilung der Kopiezahlallele der MLVA-Regionen B7 und E7 eine nahe Verwandtschaft der Linien II und III angezeigt werden, während keine Beziehung zwischen der Linie III und dem Cluster I existierte (Abb. 3.10). Eine Beziehung zwischen Isolaten der Linien II und III ließe sich ebenfalls anhand der Verteilung des Markers CDR20291\_1775 und der Fluorchinolonresistenz ableiten. Dahingegen wiesen einzelne Isolate der Linie III identische Allele im MLVA-Locus G8, C6 und A6 vor allem mit dem deutschen Isolat D12 des Clusters I auf, worauf die Trennung der Linien II und III zurückzuführen ist. Identische Allele konnten aber auch in anderen Linien des MLVA-MST nachgewiesen werden, so dass von zufälligen Ähnlichkeiten durch Homoplasie ausgegangen werden kann. Der Ausschluss einzelner Isolate wie des Stammes D12 aus dem Datensatz würde zu völlig unterschiedlichen Verzweigungen im MST führen, was die Instabilität der generierten Cluster zeigt. Des Weiteren waren zwei MLVA-Loci (F3 und H9) völlig invariant in allen untersuchten Isolaten, wodurch das Auflösungsvermögen phylogenetischer Beziehungen zusätzlich verringert wurde (Abb. 3.10).

Die konvergente Evolution identischer Allele in verschiedenen Linien und die Konserviertheit der zwei MLVA-Loci führen dazu, dass das gegenwärtig für *C. difficile* verwendete MLVA-Schema ungeeignet ist, um die Verwandtschaftsverhältnisse phylogenetisch entfernter Stämme korrekt abzubilden. Allerdings konnte die MLVA die nahe Verwandtschaft aktueller Isolate unterschiedlicher geographischer Herkunft aufzeigen, auf die im Folgenden eingegangen wird.





**Abb. 3.10:** Verteilung der Allele einzelner MLVA-Wiederholungsregionen im *Minimum Spanning Dendrogramm*. Eine identische Farbe entspricht einer übereinstimmenden Kopiezahl innerhalb der jeweiligen MLVA-Wiederholungssequenz. Beim MLVA-Lokus A6 wurden zusätzlich die aus der Verteilung des Markers CDR20291\_1775 und der Fluorchinolonresistenz abgeleiteten Cluster I-III sowie der *C. difficile* Stamm D12 mit dargestellt.

### 3.3.4 Populationsgeschichte und geographische Ausbreitung des Ribotyps 027

Über die Korrelation der MLVA-Ergebnisse mit der geographischen Herkunft der Isolate war es auf der einen Seite möglich, Verwandtschaftsverhältnisse internationaler Isolate abzubilden, welche für die globale Ausbreitung von Stämmen des Ribotyps 027 sprechen, aber auch Unterschiede zwischen Stämmen identischer Herkunft aufzuzeigen, die auf die Ausbreitung einer neuen Variante des Ribotyps 027 hinweisen.

So konnte gezeigt werden, dass 16 aktuelle deutsche Isolate, die 2007-08 in 12 unterschiedlichen Städten gesammelt wurden, ein stabiles radiales Cluster im MST bildeten, dessen Wurzel Isolate aus Stuttgart und Trier darstellten (D4, R, D17), was in Übereinstimmung mit den ersten Nachweisen des Ribotyps in Deutschland steht (Abb. 3.9) (Kleinkauf *et al.*, 2007; Zaiß *et al.*, 2007). Die meisten dieser aktuellen deutschen Isolate wurden durch eine STRD < 10 (engl. *summed tandem repeat difference*) in maximal zwei divergenten MLVA-Regionen charakterisiert, was einen hohen Grad an Verwandtschaft und eine klonale Ausbreitung des Ribotyps 027 ausgehend vom Südwesten Deutschlands indiziert.

Diese aktuellen deutschen Stämme des Ribotyps 027 zeigten eine Verwandtschaft mit epidemischen kanadischen Isolaten, welche zwischen 2005 und 2007 in Sherbrooke, Quebec isoliert wurden und auch die kanadischen Isolate wiesen ein stabiles Cluster auf, welches durch eine STRD < 10 in maximal zwei unterschiedlichen Regionen charakterisiert wurde (Abb. 3.9).

Diese aktuellen Stämme, die alle eine Resistenz gegen Fluorchinolone und ein Markergen des Transposons CTnCD5b aufwiesen, wurden dabei deutlich von Stämmen identischer geographischer Herkunft getrennt, die sensibel waren und das Transposon nicht akquiriert haben. Zum Beispiel wurde das deutsche Cluster aktueller Stämme deutlich (fünf unterschiedliche MLVA-Regionen) von zwei historischen deutschen Isolaten, die 1990 in Hamburg asserviert wurden (D21, D22) und zwei sporadisch 2006 identifizierten, Fluorchinolon sensiblen und CDR20291\_1775 negativen Isolaten aus Freiburg (D14, D15) unterschieden (Abb. 3.9, Tab. A9). Der ebenfalls aus dem Cluster ausgegliederte Stamm D16 wurde 2008 in einem Krankenhaus in Halle (Saale) isoliert. Dieser Stamm war zwar hoch resistent gegenüber Fluorchinolonen (MHK > 32 mg/l), es konnte aber wieder nicht das Transposon-spezifische Gen CDR20291\_1775 nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich hierbei um einen historischen Haplotyp des Ribotyps 027 mit konvergent entwickelter Resistenz handelt (Abb. 3.9).

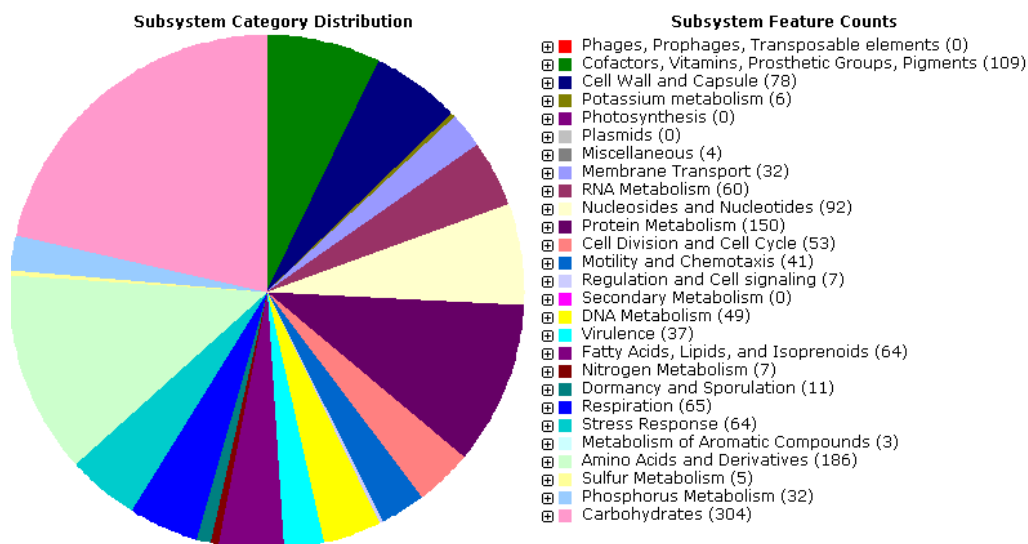
Auf die gleiche Weise wie bei den deutschen Isolaten wurden Fluorchinolon-resistente, CDR20291\_1775 positive Isolate aus Sherbrooke, Toronto und Montreal deutlich (vier bis fünf unterschiedliche Regionen) von drei Fluorchinolon sensiblen und CDR20291\_1775 negativen Isolaten aus Toronto getrennt (C5, C10, C12 – Abb. 3.9, Tab. A9). Diese Fluorchinolon sensiblen, CDR20291\_1775 negativen kanadischen Isolate befanden sich genauso wie die deutschen Isolate aus Freiburg und Halle in Bereichen des MST, welche zahlreiche historische Stämme, die sporadisch in den Jahren vor den ersten bekannten Ausbrüchen 2001 asserviert wurden, einbezogen - wie zum Beispiel Stämme, die Ende der 1990er Jahre in Schweden isoliert wurden (S1-3), die 1990 asservierten Isolate aus Hamburg (D21, 22), ein japanisches Isolat aus 2001 (J2) und den 1985 identifizierten Stamm CD196 aus Paris (Abb. 3.9, Tab. A8). Diese Äste des MST repräsentierten voraussichtlich eine ursprüngliche Population des Ribotyps 027 (Abb. 3.9), historische Haplotypen, die, wie anhand aktueller Isolationsdaten ersichtlich, noch oft in der aktuellen Population persistieren (Tab. A8). Dabei spielen diese Stämme anscheinend keine Rolle in der gegenwärtig ablaufenden Ribotyp 027 Epidemie, wie anhand der nahen Verwandtschaft aktueller kanadischer und deutscher Isolate und der deutlichen Trennung zu historischen Genotypen ersichtlich. Isolate dieser historischen Genotypen wiesen dabei eine sehr heterogene Clusterung bezüglich der geographischen Herkunft auf. Es ist in diesen Fällen aber davon auszugehen, dass besonders die alten, sehr weit divergierten Haplotypen von Homoplasie betroffen sind und dass die MLVA bei der kleinen Stichprobe an Isolaten die Verwandtschaftsverhältnisse nicht korrekt abbilden kann.

### 3.3.5 Vergleichende Genomanalysen des *C. difficile* Ribotyps 027

Um die evolutionären Hintergründe der globalen Ausbreitung des *C. difficile* Ribotyps 027 verstehen und einen weiteren Einblick in die Entstehungsgeschichte des Stammes erhalten zu können, sind höher auflösende Verfahren wie die Sequenzierung und Re-Sequenzierung internationaler Genome nötig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom eines 1990 isolierten Ribotyp 027 Isolats aus Hamburg sequenziert (D22). Über die *de novo* Assemblierung des Genoms wurden 193 Kontigs mit insgesamt 4.058.109 bp erhalten, bei einer durchschnittlichen Kontig-Länge von 21 kb und einer maximalen Länge von 150 kb. Die Annotation erfolgte mit Hilfe des RAST (engl. *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) Servers (Aziz *et al.*, 2008), der Software Kodon (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) und Artemis (Rutherford *et al.*,

2000) basierend auf bereits annotierten Genomen. Insgesamt konnten 3740 offene Leseraster identifiziert werden, darunter 3675 Protein-kodierende Regionen und 65 RNAs (Abb. 3.11). Wie für Vertreter der Firmicutes typisch lag der G/C-Gehalt mit 28,4 % sehr niedrig (Tab. 3.6).



**Abb. 3.11:** Annotation chromosomaler DNA des *C. difficile* Stammes D22 mit Hilfe des RAST-Servers. RAST - engl. *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (Aziz *et al.*, 2008)

**Tab. 3.6:** Übersicht über die Sequenzierung und Annotation chromosomaler DNA des *C. difficile* Stammes D22. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Roche 454 GS-FLX Sequenzierer, die Annotation mit Hilfe des RAST Servers (Aziz *et al.*, 2008), der Software Kodon (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) und Artemis (Rutherford *et al.*, 2000).

Merkmal	
Anzahl Reads	267.859
Anzahl Kontigs	193
Durchschnittliche Kontig Länge (kb)	21
Maximale Kontig Länge (kb)	150
Länge insgesamt (bp)	4.058.109
Abdeckung	21,7x
G/C-Gehalt	28,4
Anzahl Protein kodierender Sequenzen	3675
Anzahl RNAs	65
Durchschnittliche Genlänge (bp)	943

Die Genomsequenz des deutschen Isolats von 1990 wurde mit bereits publizierten *C. difficile* Genomen des Ribotyps 027 verglichen (Tab. 3.7).

**Tab. 3.7:** Übersicht der sequenzierten *C. difficile* Stämme des Ribotyps 027

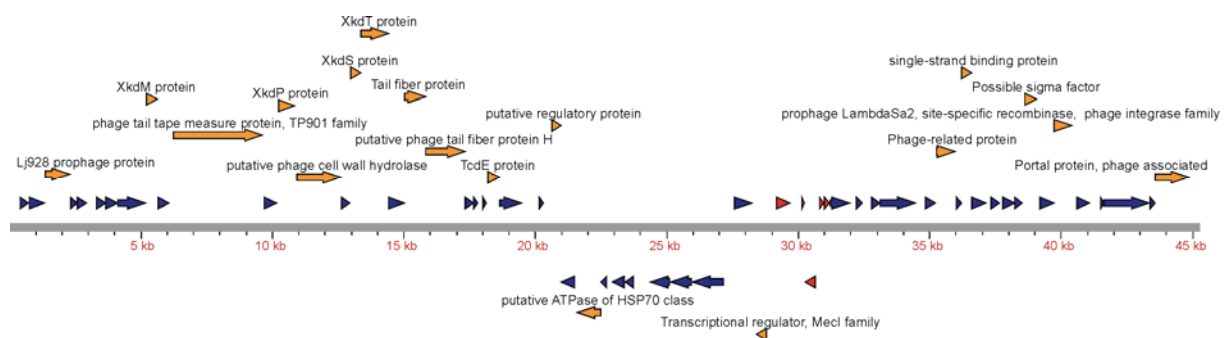
Stamm	Jahr der Isolation	Herkunftsland	Ursprung	Sequenzierungsmethode (Abdeckung)	Referenz
BI-1*	1988	USA	Mensch	454 (15x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-2	1991	USA	Mensch	Solexa (29x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-3	1990	USA	Mensch	Solexa (59x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-5	1995	USA	Mensch	Solexa (74x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-6	2003	USA	Mensch	Solexa (38x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-6p	2004	USA	Mensch	Solexa (60x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-7	2003	USA	Mensch	Solexa (49x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-10	2001	USA	Mensch	Solexa (16x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-13	2004	USA	Mensch	Solexa (62x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
BI-15	2004	USA	Mensch	Solexa (90x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
CD196*	1985	Frankreich	Mensch	454 (14x)	(Stabler <i>et al.</i> , 2009)
R20291*	2006	UK	Mensch	454 (15x)	(Stabler <i>et al.</i> , 2009)
2004013	2004	USA	Mensch	Solexa (37x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2004163	2004	USA	Mensch	Solexa (32x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2004102	2004	USA	Mensch	Solexa (50x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2004118	2004	USA	Mensch	Solexa (30x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2006439	2006	USA	Nahrung	Solexa (38x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2007140	2007	USA	Mensch	Solexa (29x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2007837	2007	USA	Mensch	Solexa (53x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2007825	2007	USA	Mensch	Solexa (27x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2007218	2007	USA	Nahrung	Solexa (29x)	(He <i>et al.</i> , 2010)
2007855*	2007	USA	Rind	454 (16x)	(He <i>et al.</i> , 2010)

\*Accession Nummern: BI-1, FN668941; 2007855, FN665654; CD196, FN538970; R20291, FN545816

Zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente lagen Sequenzinformationen von vier vollständig sequenzierten *C. difficile* Stämmen des Ribotyps 027 aus drei unterschiedlichen Ländern in öffentlich zugänglichen Datenbanken vor (He *et al.*, 2010; Stabler *et al.*, 2009). Des Weiteren wurden uns vom Wellcome Trust Sanger Institut in Hinxton, England Informationen zu Einzelnukleotidpolymorphismen im Kerngenom von 18 weiteren mit der Solexa-Technik sequenzierten Isolaten zur Verfügung gestellt. Insgesamt konnte durch die Genome eine Zeitspanne von 1985-2007 abgedeckt werden (Tab. 3.7).

Eine vergleichende Genomanalyse des deutschen Isolats D22 von 1990 mit der Sequenz des französischen Isolats CD196 von 1985 als Referenz ergab eine Sequenzabdeckung von 99,2 %. Unterschiede im Gengehalt blieben auf mobile Elemente beschränkt. So konnte beim

deutschen Isolat ein bisher nicht weiter beschriebener, 45 kb großer Prophage identifiziert werden. Über die Annotation der Sequenz mit Hilfe des RAST-Servers wurden 65 Proteinkodierende Leseraster ermittelt, wobei keine Sequenzhomologien zu bisher bekannten Virulenzfaktoren existierten (Abb. 3.12). Während weder der historische, französische Stamm CD196 noch die aktuellen Stämme R20291 (UK, 2006) und 2007855 (USA, 2007) den Bakteriophagen aufwiesen, konnte eine große Abdeckung zum Plasmid pCDBI1 (93 %, E-Wert = 0), welches beim amerikanischen Stamm BI-1 von 1988 nachgewiesen aber nicht weiter charakterisiert wurde, identifiziert werden (He *et al.*, 2010). Da neben zahlreichen Phagenproteinen keines der Proteine Homologien zu bekannten Plasmid-Proteinen aufwies, die typischerweise im Zusammenhang mit der Replikation (Replicase), dem Transfer (Relaxasen der Mob-Familie) oder Erhalt (Antibiotikaresistenz, Toxin-Antitoxin System) des Plasmids in der Zelle stehen, muss von einer Fehlannotation ausgegangen werden.



**Abb. 3.12: Genkarte des Prophagen  $\Phi$ BI-1.** Blau dargestellt sind Leseraster hypothetischer Proteine, rot deletierte Leseraster hypothetischer Proteine im Stamm D22 und orange annotierte Proteine.

Da der Prophage ebenfalls in leicht deletierter Form in internationalen *C. difficile* Isolaten unterschiedlicher PCR-Ribotypen und Epochen (Isolat BI-9, Ribotyp 001, USA 2001 - Abdeckung 93 %, E-Wert = 0 und Isolat M68, Ribotyp 017, Irland 2006 - Abdeckung 86 %, E-Wert = 0) identifiziert werden konnte, ist von einer weiten Verbreitung auszugehen. Wie durch die fehlende Amplifikation der Marker CDR20291\_1752 und 1775 bereits erwartet, war das beim Ausbruchstamm R20291 identifizierte konjugative Transposon CTnCD5b im deutschen Stamm D22 abwesend (He *et al.*, 2010; Stabler *et al.*, 2009).

Um die Phylogenie der 23 sequenzierten Genome des Ribotyps 027 darstellen und Rückschlüsse auf die Mikroevolution ziehen zu können, wurden phylogenetische Analysen basierend auf Genom-weiten Einzelnukleotidpolymorphismen durchgeführt. Die Detektion der

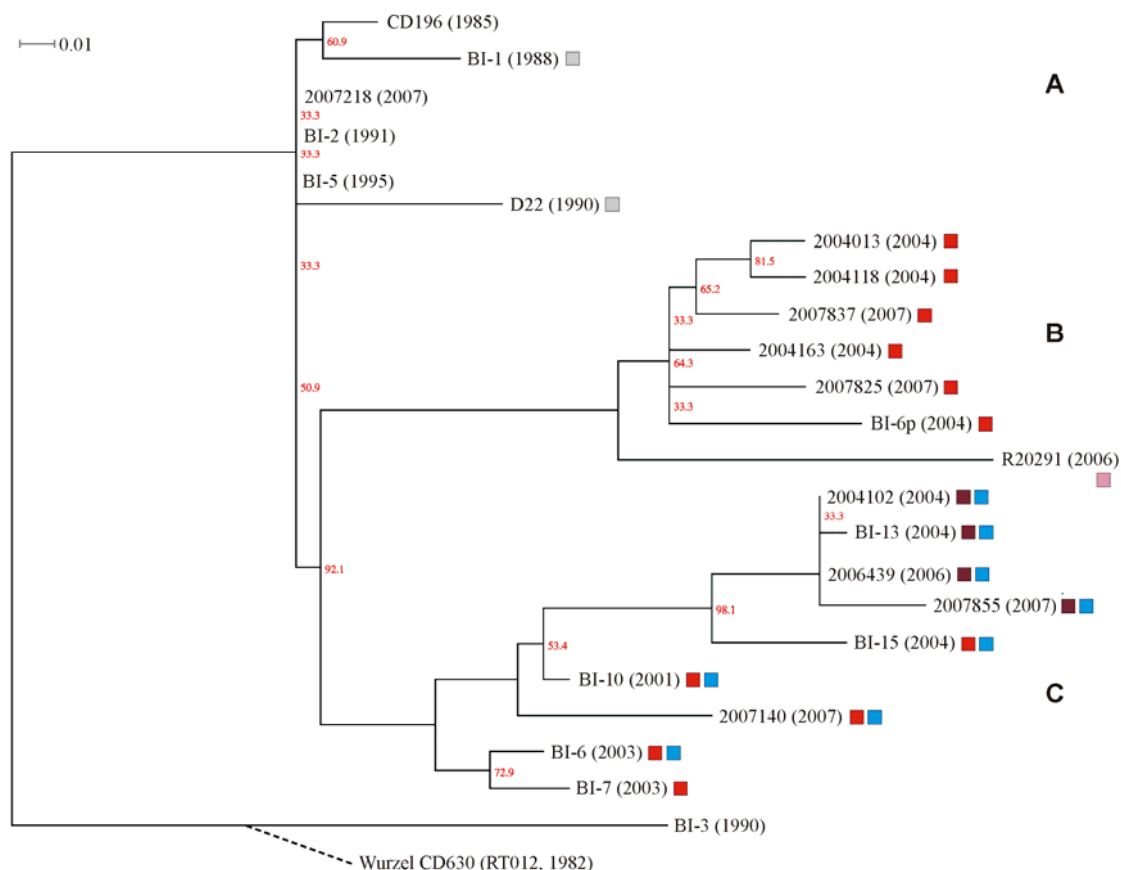
SNPs erfolgte über die Sequenzalignierung der Genome mit Hilfe der Programme Kodon v3.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) und MUMmer v3.20 (Nucmer Algorithmus (Kurtz *et al.*, 2004)) im Vergleich zum historischen französischen Stamm CD196 als Referenz.

Um SNPs, welche auf den horizontalen Transfer genetischer Elemente oder Sequenzierfehlern zurückzuführen sind, ausschließen zu können, wurden Sequenzunterschiede in mobilen genetischen Elementen (Prophagen, Transposons, Insertionselementen *usw.*), Wiederholungssequenzen, Bereichen von Kontig-Enden und in nicht in allen Genomen vorhandenen und daher möglicherweise rekombinierten Regionen aus dem Datensatz entfernt. Insgesamt konnten auf diese Weise 132 SNPs in den 23 analysierten Genomen des Ribotyps 027 identifiziert werden (Tab. A10). Die SNPs der einzelnen Stämme wurden als phylogenetische Marker gegeneinander ausgerichtet und basierend auf dem TVM Substitutionsmodel (engl. *Transversional Model*) (Posada & Crandall, 1998) ein *Maximum Likelihood* Dendrogramm generiert (Abb 3.13). Da phylogenetische Analysen basierend auf ganzen Genomsequenzen eine nahe Verwandtschaft des Ribotyps 027 zum Typ 012 aufzeigten, ist anhand des *C. difficile* Stammes 630 die Wurzel des Stammbaumes ermittelt worden (He *et al.*, 2010).

Die vergleichenden Genomanalysen bestätigten die durch Mutationsanalysen (Abschnitt 3.3.1) festgestellte geringe Diversität des *C. difficile* Ribotyps 027. So entsprachen die 132 SNPs in 23 Genomen unter Berücksichtigung der ausgeschlossenen Bereiche einer abgeleiteten Nukleotiddiversität ( $\pi$ ) von ungefähr  $1,9 \times 10^{-6}$ . Der deutsche Stamm D22 von 1990 wies im Vergleich zum ebenfalls historischen französischen Stamm CD196 von 1985 nur neun Punktmutationen auf; drei synonyme und fünf nicht-synonyme in Protein-kodierenden Regionen, sowie eine Substitution in einem nicht-kodierenden Bereich (Tab. A11). Nur zwei der Mutationen traten in metabolischen Haushaltsgenen auf, die meisten der Substitutionen waren mit Oberflächen-exponierten Proteinen oder Virulenzdeterminanten assoziiert.

Wie erwartet wurde das deutsche Isolat mit weiteren historischen Stämmen im phylogenetischen Stammbaum gruppiert (Abb. 3.13 – Cluster A). Die einzige Ausnahme bildete der Stamm 2007218, ein 2007 aus Nahrungsmitteln gewonnenes Isolat aus den USA. Da dieser aktuelle Stamm eine identische Sequenz im Kerngenom im Vergleich zum historischen amerikanischen Stamm BI-2 von 1991 und nur drei SNPs Unterschied zum französischen Stamm CD196 aufwies, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen historischen Genotyp handelt, der noch in der aktuellen Population persistiert.

Diese internationalen Stämme, die mit der einen Ausnahme vor den ersten bekannten Ausbrüchen 2001 isoliert worden sind, konnten im Dendrogramm von Stämmen diskriminiert werden, die alle ein aktuelleres Isolationsdatum aufwiesen.



**Abb. 3.13:** *Maximum Likelihood* Phylogramm basierend auf 132 SNPs im Kerngenom von 23 internationalen *C. difficile* Stämmen des Ribotyps 027. Neben der Stammbezeichnung ist in Klammern das Jahr der Isolation angegeben. Zusätzliche Informationen zu den Stämmen befinden sich in Tabelle 3.7. Die Topologie des Stammbaumes wurde mit einer *Bootstrap*-Analyse mit 1000 Wiederholungen überprüft. Rot dargestellt sind *Bootstrap*-Werte < 100 %. Der Skalierungsbalken gibt die Anzahl an Substitutionen pro homologer Position an. Informationen zu mobilen genetischen Elementen (■ = CTnCD5, ■ = CTnCD5b, ■ = CTnCD5c, ■ = CTnCD11, ■ = ΦBI-1CD5), Einzelnukleotidpolymorphisms der amerikanischen Stämme sowie des *C. difficile* Stammes 630 (Ribotyp 012) zur Identifizierung der Wurzel entstammen der Veröffentlichung von He *et al.*, 2010.

So fällt der englische Stamm R20291, der 2006 bei einem Ausbruch in Stoke Mandeville as serviert worden ist, in ein Cluster, in welchem ansonsten ausschließlich aktuelle amerikanische Stämme vertreten sind (Abb.3.13 – Cluster B). Im Vergleich zum 21 Jahre jüngeren französischen Isolat CD196 konnten nur 25 SNPs identifiziert werden; sechs synonyme, stille Mutationen und 15 nicht-synonyme Substitutionen in Protein-kodierenden Regionen, sowie



vier Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen (Tab. A11). Mutationen in metabolischen Haushaltsgenen wurden nur in fünf Fällen registriert, was die geringe Diversität des Kerngenoms von *C. difficile* unterstreicht. Dennoch wiesen die aktuellen amerikanischen Isolate eine höhere Diversität als erwartet auf und wurden in zwei unterschiedlichen Clustern gruppiert (Abb. 3.13 – Cluster B, C).

Untersuchungen von He *et al.*, 2010 konnten zeigen, dass alle aktuellen Isolate eine Variante des konjugativen Transposons CTnCD5 im Genom aufwiesen (Abb. 3.13). Bei vier Stämmen in Cluster III (2004102, BI-13, 2006439, 2007855) war zusätzlich eine 7,5 kb große Kasette mit ORFs für eine DNA-Rekombinase und Aminoglycosidresistenz (2'-Aminoglycosid-phosphotransferase, 6'-Aminoglycosid-N-acetyltransferase - CTnCD5c) und beim Stamm R20291 der 20 kb große Phage SMPI (engl. *Stoke Mandeville Page Island 1*) in das Transposon CTnCD5 integriert (Abb. 3.13) (Stabler *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde in allen Isolaten des Clusters III mit Ausnahme des Stammes BI-7 ein zusätzliches Transposon (CTnCD11) nachgewiesen, welches für eine Resistenz gegenüber Erythromycin kodiert (rRNA Adenin-N-6-methyltransferase) und im Zusammenhang mit der Aufspaltung aktueller Ribotyp 027 Stämme stehen könnte. Aufgrund der insgesamt geringen Diversität und der dadurch bedingten oft niedrigen *Bootstrap*-Werte können jedoch auch Fehlgruppierungen nicht ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse sprechen aber dafür, dass sich ausgehend von einer historischen Population neue Linien des Ribotyps 027 ausgebildet haben. Inwieweit eine oder mehrere dieser Linien für die derzeitige Ausbreitung des Ribotyps 027 verantwortlich sind, kann aufgrund der bisher geringen Anzahl internationaler Stämme im Datensatz nicht eindeutig geklärt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Molekulare Epidemiologie von *C. difficile* in Deutschland

Die Inzidenz von *C. difficile* Infektionen ist in den letzten 10 Jahren weltweit signifikant gestiegen (Kuijper *et al.*, 2006a; Rupnik *et al.*, 2009). So wurde auch in Deutschland entsprechend einer Analyse von Entlassungsdiagnosen ein deutlicher Anstieg der Infektionen von 1,3 Fällen pro 100.000 stationär behandelten Patienten im Jahr 2000 auf 97,5 im Jahr 2006 verzeichnet (Vonberg *et al.*, 2007; Vonberg & Gastmeier, 2008). Während der Anstieg in Nordamerika zum Teil mit der Ausbreitung stärker virulenter *C. difficile* Stämme des PCR-Ribotyps 027 assoziiert werden konnte (Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005), war es aufgrund fehlender Daten zur molekularen Typisierung von *C. difficile* in Deutschland bisher nicht möglich, den Inzidenzanstieg mit der Ausbreitung bestimmter Erregervarianten zu korrelieren.

#### 4.1.1 Epidemische Verbreitung des Ribotyps 001 in Deutschland

Im August 2007 erfolgte über die Etablierung der PCR-Ribotypisierung am Robert Koch-Institut retrospektiv der erste Nachweis einer schweren Infektion aufgrund des Ribotyps 027 in Deutschland bei einem an einer Pseudomembranösen Kolitis verstorbenen Patienten aus Stuttgart (Zaiß *et al.*, 2007). Zeitgleich konnte ein Ausbruch in sechs Krankenhäusern der Region Trier detektiert und im Rahmen der Untersuchungen die bereits endemische Verbreitung des Ribotyps 027 im Landkreis Trier-Saarburg nachgewiesen werden (Kleinkauf *et al.*, 2007).

Um einen Überblick über die Ribotypverteilung und deren Antibiotikaresistenz im ganzen Bundesgebiet zu erhalten, wurde eine Studie initiiert, in dessen Rahmen von Januar bis Dezember 2008 insgesamt 670 Isolate aus schweren Verläufen, isoliert in 84 Krankenhäusern, molekular typisiert wurden (Zaiß *et al.*, 2010). Extrapoliert man die Zahlen der CDAD-KISS Studie 2008 (*Clostridium difficile*-assoziierte Diarrhöe Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System – [www.nrz-hygiene.de](http://www.nrz-hygiene.de)), die 5.640 CDI-Fälle, davon 6 % schwere Verläufe (Definition gemäß §6 Abs. 1 Nr.5a Infektionsschutzgesetz), bezogen auf 1,6 Millionen vollstationäre Patienten identifizierte, auf die Gesamtzahl vollstationärer Patienten in Deutschland (17 Mil-

lionen), so kann von 58.000 CDI-Fällen einschließlich 3.500 schwerer Verläufe im Jahr 2008 ausgegangen werden. Dementsprechend repräsentierten die 670 Isolate ca. 20 % der schweren CDI-Fälle, die in diesem Jahr diagnostiziert wurden.

Von den 57 identifizierten Ribotypen war Ribotyp 001 bei weitem der prävalenteste Typ, verantwortlich für schwere Infektionen in 70 % der einsendenden Krankenhäuser (Tab. 3.2). Eine hohe Prävalenz des Ribotyps (59 % der typisierten Isolate) konnte ebenfalls in einer süddeutschen Studie bestätigt werden, welche die Ribotypverteilung in zwei Krankenhäusern in Bayern im Jahre 2008 untersucht hat (Borgmann *et al.*, 2008). Wie in unserer Studie gezeigt werden konnte, waren *C. difficile* Stämme des Ribotyps 001 endemisch in Krankenhäusern im gesamten Bundesgebiet (Abb. 3.3). Dahingegen blieb die Verteilung des Ribotyps 027 vor allem auf den Südwesten Deutschlands beschränkt, mit nur zwei sporadischen Fällen in Ostdeutschland. Es ist entsprechend davon auszugehen, dass der bisherige bundesweite Inzidenzanstieg der CDI nicht mit der Verbreitung des Ribotyps 027 assoziierbar ist (Vonberg *et al.*, 2007).

Stattdessen wird der Inzidenzanstieg mehrere Gründe haben und ist sicherlich im Zusammenhang mit dem demographischen Wandel in Deutschland zu sehen, der dazu beiträgt, dass es in Krankenhäusern zur Kohortierung einer immer älter werdenden, immundefizienten Patientenschaft kommt, der Hauptrisikogruppe einer *C. difficile* Infektion (Kuijper *et al.*, 2006a). Verstärkt wird diese Entwicklung durch gesundheitspolitische Maßnahmen, die eine ambulante Behandlung jüngerer Patienten fördern, sowie durch überfüllte Stationen, die das Transmissionsrisiko erheblich erhöhen (Kaier *et al.*, 2010). Weiterhin wird ein mangelndes Hygienemanagement und fehlende Schulung des Krankenhauspersonals, ein schlecht kontrolliertes Antibiotikaregime, welches zu einer zu häufigen Verschreibung von Breitbandantibiotika und fehlindizierten Therapien führt, aber auch eine verbesserte *C. difficile* Diagnostik und stärkere Sensibilisierung der Ärzte zum Anstieg der CDI Inzidenz beitragen.

Zukünftige Untersuchungen müssen aber zeigen, ob Stämme des Ribotyps 027 ähnlich wie in England oder Kanada in der Lage sind, den bereits in der Krankenhausumgebung etablierten Ribotyp 001 zu verdrängen und ob dies zu einem weiteren Inzidenzanstieg und einer erhöhten Mortalität der CDI beiträgt. So konnte in England Ende der 1990er Jahre der Ribotyp 001 noch bei über 50 % der CDI-Fälle nachgewiesen werden, 2008 sank der Anteil auf unter 8 % ab. Dahingegen wurden bis 2003 nur zwei sporadische Fälle einer Infektion aufgrund des *C. difficile* Ribotyps 027 registriert, 2006 war der Ribotyp schon mit über 25 % der CDI-Fälle der zweithäufigste Typ und 2008 stieg der Anteil weiter auf über 40 % an (Brazier, 1998; Brazier *et al.*, 2007; Brazier *et al.*, 2008). Eine ähnliche Entwicklung zeichnete sich in der

kanadischen Provinz Quebec ab, wo ein deutlicher Wechsel von über 80 % der CDI-Fälle durch Ribotyp 001 im Jahr 2000 auf über 80 % Ribotyp 027 Fälle 2007 zu beobachten war (Labbe *et al.*, 2008). Dieser Wechsel war mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität von *C. difficile* Infektionen assoziiert (Labbe *et al.*, 2008; Loo *et al.*, 2005), so dass auch in Deutschland Hygienerichtlinien und Maßnahmen zur Infektionskontrolle in Krankenhäusern intensiviert werden sollten, um eine erfolgreiche Infektionsprävention gewährleisten und weitere Ausbreitung des Ribotyps verhindern zu können. Allerdings zeigen die Ergebnisse unserer Studie deutlich, dass schwere Verläufe einer CDI nicht nur durch Isolate des Ribotyps 027, sondern alle Toxin-exprimierenden Stämme induziert werden können und dass aufgrund der steigenden deutschlandweiten CDI-Inzidenz ein verbessertes Hygieneregime nicht nur auf den Nachweis des Ribotyps 027 reduziert werden sollte.

*C. difficile* Stämme des Ribotyps 001 sind genauso wie Stämme des Ribotyps 027 in der Lage, die beide großen Zytotoxine TcdA und TcdB zu exprimieren, man konnte aber weder eine Deletion im Toxinrepressor TcdC noch erhöhte *in vitro* Toxinexpression nachweisen. Im Gegensatz dazu besitzen Isolate des Ribotyps 078 wie die des Ribotyps 027 eine sinnentstellende Mutation (Position 184: CAA zu TAA) und damit einen stark verkürzten negativen Regulator TcdC (von 232 auf 61 Aminosäuren) und sind darüber hinaus ebenfalls in der Lage, die ADP-Ribosyltransferase („binäre Toxin“) zu exprimieren (Curry *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2008). Isolate des Ribotyps 078 waren die zweithäufigsten in unserer Stammsammlung und konnten in 23 % der einsendenden Krankenhäuser nachgewiesen werden. Eine hohe Prävalenz des Ribotyps wurde ebenfalls in Schweinen und Kälbern diagnostiziert (> 80 % der typisierten Isolate) und eine zoonotische Verbreitung wird diskutiert (Debast *et al.*, 2009; Jhung *et al.*, 2008; Keel *et al.*, 2007; Rupnik *et al.*, 2008). In den Niederlanden und anderen europäischen Ländern wurde in den letzten Jahren ein Inzidenzanstieg mit Infektionen des Ribotyps 078 vor allem im ambulanten Bereich beobachtet und es bleibt abzuwarten, ob auch in Deutschland eine ähnliche Entwicklung zu verzeichnen ist (Goorhuis *et al.*, 2008; Kuijper *et al.*, 2008; Rupnik *et al.*, 2009).

#### 4.1.2 Hohe Prävalenz der Fluorchinolonresistenz bei *C. difficile* in Deutschland

Solange die genauen Hintergründe der epidemischen Verbreitung einzelner Ribotypen aber nicht verstanden sind, ist es nicht möglich, spezifische Interventionsstrategien abzuleiten. Da vor allem eine zunehmende Antibiotikaresistenz neben der erhöhten Inzidenz Antibiotika-

induzierter Koliden mitverantwortlich wäre für die selektierte Verbreitung resistenter Stämme und damit maßgeblich zu einer veränderten Epidemiologie des Erregers beiträgt, wurden die Isolate auf Resistenz gegenüber den Therapieantibiotika Metronidazol und Vancomycin getestet. Dabei konnten im Kontrast zu einer englischen Studie weder Resistenzen noch signifikant erhöhte MHK-Werte unter epidemischen Ribotypen im Vergleich zu weniger prävalenten Ribotypen nachgewiesen werden (Brazier *et al.*, 2008).

Des Weiteren wurde in mehreren Studien die Exposition gegenüber Fluorchinolonen als unabhängiger Risikofaktor für schwere Verläufe und die Ausbreitung des Ribotyps 027 beschrieben und eine strikte Limitierung der Applikation dieser Antibiotikaklasse zur Verminderung der CDI-Inzidenz und Ausbreitung hoch virulenter Epidemiestämme empfohlen (Gaynes *et al.*, 2004; Muto *et al.*, 2005; Pepin *et al.*, 2005). Fluorchinolone stellen nach den  $\beta$ -Lactamen die am zweithäufigsten eingesetzten Antibiotika im Krankenhaus dar und werden vor allem in hämatonkologischen Abteilungen zur Infektionsprophylaxe eingesetzt (<http://www.bvl.bund.de/>). In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Isolate des Ribotyps 001 und 027 hochresistent gegenüber Moxifloxacin und Levofloxacin sind, eine Resistenz aber auch bei in Deutschland weniger häufigen Ribotypen verbreitet ist (Tab. 3.3). Die molekulare Charakterisierung der Resistenz ergab, dass die Mehrheit der resistenten Isolate unabhängig vom Ribotyp die identische Thr-82→Ile Mutation in der GyrA Untereinheit der DNA-Gyrase aufwies. Diese Substitution wurde bereits in mehreren Studien mit Fluorchinolonresistenz assoziiert. So beschrieb Spigaglia *et al.*, 2008 diesen Austausch in 77 Fluorchinolonresistenten Isolaten, die aus 12 europäischen Ländern stammend 19 unterschiedliche Ribotypen einschlossen, und das identische *gyrA* Allel konnte ebenfalls in Isolaten aus China (Huang *et al.*, 2009) und Kanada identifiziert werden (Walkty *et al.*, 2010). Weiterhin wurde in Studien demonstriert, dass sich die Thr-82→Ile Substitution und assoziierte Resistenz leicht durch subinhibitorische Fluorchinolonkonzentrationen induzieren lässt (Deneve *et al.*, 2009; Saxton *et al.*, 2009). Dies zeigt, dass Thr-82 eine zentrale Rolle bei der Ausbildung der Fluorchinolonresistenz in *C. difficile* spielt und durch die häufige Verschreibung dieser Antibiotikaklasse mehrfach konvergent identische Gyrasemutationen in unterschiedlichen Ribotypen selektiert wurden. Thr-82 in *C. difficile* entspricht Ser-83 in der Resistenz-determinierenden Region (QRDR - engl. *quinolone resistance-determining region*) der Gyrase von *Escherichia coli* und Mutationen an homologer Position konnten mit Fluorchinolonresistenz in zahlreichen Bakterien assoziiert werden (Ackermann *et al.*, 2001; Hooper, 1999). Aufgrund der weiten Verbreitung der Fluorchinolonresistenz in *C. difficile* unterschiedlicher Ribotypen kann davon ausgegangen werden, dass die Resistenz alleine kein Selektionsvorteil

für die starke Prävalenz des Ribotyps 001, bzw. Ausbreitung der Ribotypen 027 oder 078 darstellen kann (Zaiß *et al.*, 2010).

#### **4.1.3 Ausblick zur Epidemiologie von *C. difficile***

Um die Hintergründe der starken Prävalenz einiger weniger Stämme verstehen und epidemiologische Zusammenhänge erkennen zu können ist ein fundiertes Verständnis der Populationsstruktur von *C. difficile* erforderlich. Nur wenn die Verteilung und Frequenz untersuchter Merkmale in der zugrundeliegenden Population bekannt sind und Veränderungen über die Zeit verfolgt werden, können Rückschlüsse auf die Gründe der Verbreitung bestimmter Infektionserreger gezogen und geeignete Interventionsmaßnahmen abgeleitet werden.

Zukünftige Untersuchungen müssen weiterhin klären, inwiefern die auftretenden epidemischen Stämme rein Krankenhaus adaptiert oder auch im ambulanten Bereich als Kommensale zu finden sind und welche Rolle mögliche Umwelt- oder Tierreservoirs in der Transmission spielen (Brazier, 1998; Rupnik, 2007; Songer *et al.*, 2009). Epidemiologische Studien werden dabei durch schlecht standardisierbare und vergleichbare Typisierverfahren wie die PCR-Ribotypisierung erschwert und es ist bisher sehr wenig über die Verteilung der Stämme in der Gesamtpopulation bekannt.

#### **4.2 Etablierung eines neuen, DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile***

Eine erfolgreiche Infektionskontrolle setzt die zuverlässige Identifizierung epidemischer Stämme und damit ein geeignetes Typisierverfahren der Erregerspezies voraus. Das Typisierungsergebnis sollte dabei mit epidemiologisch und klinisch bedeutsamen Daten korrelierbar sein und die Ausbreitung des Infektionserregers erfassen, sei es zur Detektion und Aufklärung lokaler Ausbrüche, zur Verifizierung von Transmissionsketten oder zur Erkennung überregionaler Epidemien. Ein Typisierverfahren muss entsprechend schnell und zuverlässig eindeutige Ergebnisse liefern, die Ergebnisse sollten reproduzierbar und zwischen verschiedenen Anwendern vergleichbar sein und die universelle Typisierbarkeit der Spezies gewährleisten.

Das gegenwärtig in Europa eingesetzte Standardverfahren für die Typisierung von *C. difficile* ist die PCR-Ribotypisierung. Die Methode erfasst den Längenpolymorphismus der ITS-Regionen zwischen 16S- und 23S-rDNA unterschiedlicher Kopien des rRNA-Operons auf einem *C. difficile* Chromosom durch PCR-Amplifikation und anschließende Gelelektrophorese.

tische Auftrennung der Spaceramplikons. Aufgrund von Unterschieden in der Laborausstattung, der Bildung von Heteroduplices durch Sequenzhomologien verschiedener ITS-Regionen und der Subjektivität in der Typzuweisung durch ähnliche Bandenmuster ist die PCR-Ribotypisierung aber nur schwer zu standardisieren und Ergebnisse sind nur bedingt zwischen verschiedenen Institutionen vergleichbar. Ein Verfahren, welches auf der Analyse von DNA-Sequenzdaten beruht, hätte dagegen den Vorteil, dass durch die Eindeutigkeit der Sequenz auch eindeutige Typen festgelegt werden könnten. Die Ergebnisse wären hoch reproduzierbar und vergleichbar und könnten leicht in Datenbanken hinterlegt werden und so zukünftige epidemiologische Studien und Surveillance-Programme erleichtern.

#### 4.2.1 Klonale Evolution der Wiederholungssequenzen TR6 und TR10

Über die Identifizierung von zwei vergleichsweise schnell evolvierenden Regionen mit Wiederholungssequenzen (TR6 und TR10, Tab. 3.4) wurde die Grundlage zum Aufbau eines neuen, DNA-Sequenz-basierten Typisierverfahrens für *C. difficile* geschaffen. Genomische Regionen mit Wiederholungssequenzen können vergleichsweise schnell durch intramolekulare Rekombination evolvieren zum Beispiel durch Paarung sequenzhomologer Bereiche (Haarnadelschleifenbildung) während der Replikation (Eisen, 1999; Levinson & Gutman, 1987; Schlotterer, 2000). Die beiden Regionen TR6 und TR10 verfügten sowohl über einen ausgeprägten Längenpolymorphismus bedingt durch die Insertion und Deletion ganzer Wiederholungseinheiten, als auch über einen Sequenzpolymorphismus durch Punktmutationen innerhalb der repetitiven Bereiche (Tab. 3.4, A3-5). Die Sequenzen der Wiederholungseinheiten beider Regionen waren hoch variabel mit einer Sequenzdiversität  $\pi$  von  $0,28 \pm 0,01$  für TR6 und  $0,23 \pm 0,01$  für TR10. Um den Einfluss von positiver Selektion auf die Evolution beider Regionen ausschließen zu können, wurde das normalisierte Verhältnis von nicht-synonymen zu synonymen Mutationen ( $K_a/K_s$ ) ermittelt. Die Wiederholungsregion TR6 befand sich in dem offenen Leseraster eines hypothetischen Proteins mit bisher unbekannter Funktion. Die Mehrheit der Nukleotidsubstitutionen war synonym ( $K_a/K_s = 0,39$ ), das heißt, die Aminosäuresequenz blieb durch den degenerierten genetischen Code unverändert. Es kann entsprechend davon ausgegangen werden, dass die Region TR6 unter stabilisierender Selektion (engl. *purifying selection*) evolviert und sich als phylogenetischer Marker eignet.

Die Region TR10 lag in einem nicht-kodierenden Bereich, was aufgrund fehlender Promotorstrukturen und transkriptioneller Regulationselemente eine neutrale Selektion indiziert. Die

Region befand sich aber in unmittelbarer Nähe zu einer hypothetischen, Oberflächen-assoziierten MDR-Efflux Pumpe, einem Resistenzmarker, welcher unter einem diversifizierenden Selektionsdruck des Immunsystems liegen könnte. Zusätzliche vergleichende Analysen beider Regionen müssen ausschließen, dass TR10 über eine genetische Kopplung (engl. *genetic hitchhiking*) ebenfalls von positiver Selektion betroffen ist und vielleicht sogar eine Korrelation der Diversität mit speziellen Resistenzprofilen besteht.

Weiterhin gab es in drei Fällen Hinweise auf Rekombination zwischen Chromosomen nicht verwandter Stämme, welche die Sequenz der repetitiven Regionen beeinflusst haben könnte. So ist der TRST-Sequenztyp tr-021 offensichtlich als Folge eines homologen Rekombinationsereignisses entstanden, da tr-021 zwar eine identische TR6 Sequenz mit dem, basierend auf Ergebnissen der MLST (identischer Sequenztyp St-39) und Ribotypisierung (identischer Ribotyp 011), nah verwandten Typ tr-011 aufwies, die Sequenzen der Wiederholungsregion TR10 aber, sowohl was die Kopiezahl als auch die Allelabfolge der Wiederholungseinheiten betraf, erheblich voneinander abwichen (Tab. A3, Abb. 3.7). Da stattdessen eine identische TR10 Sequenz von tr-021 im phylogenetisch entfernten Typ tr-005 nachgewiesen werden konnte, kann vom horizontalen Gentransfer zweier nicht verwandter Stämme ausgegangen werden (Tab. A3). In ähnlicher Weise traten erhebliche Sequenzunterschiede mit - basierend auf Ergebnissen der MLST - nah verwandten Typen in einzelnen Wiederholungsregionen der Sequenztypen tr-066 und tr-045 auf, so dass auch in diesen Fällen von einem horizontalen Austausch ausgegangen werden kann.

Da es Hinweise auf genetische Rekombination nur bei der Evolution von maximal drei von insgesamt 72 in unserer Stammsammlung vertretenen TRST-Typen gab, sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Wiederholungsregionen TR6 und TR10 hauptsächlich über die klonale Diversifizierung durch Mutationen evolvieren und der Einfluss von genetischer Rekombination als gering anzusehen ist. Eine geringe Rekombinationsrate wurde auch durch Ergebnisse der MLST bestätigt. Über die Analyse der Sequenzdiversität der sieben Haushaltsgene konnte eine achtmal höhere Wahrscheinlichkeit ermittelt werden, dass Mutationen an der Ausprägung neuer Sequenzallele beteiligt sind als Rekombinationsereignisse (Lemee *et al.*, 2004). Damit sprechen sowohl die Ergebnisse der MLST als auch die der TRST für eine klonale Populationsstruktur von *C. difficile*, die nur selten durch genetische Rekombination aufgebrochen wird. Aufgrund der klonalen Evolution wird eine Typisierung in Konkordanz zur Phylogenie von *C. difficile* auch durch die Analyse einzelner Regionen ermöglicht, da Verwandtschaftsverhältnisse nur selten durch homologe Rekombinationsereignisse verwischt werden.



Des Weiteren konnte die Stabilität und damit Eignung der Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 auch für langfristig angelegte epidemiologische Studien durch zwei *C. difficile* VPI 10463 und drei 630 Stämme demonstriert werden, die aus unterschiedlichen internationalen Laboren stammend über größere Zeiträume unabhängig voneinander kultiviert wurden und dennoch identische Sequenzen in beiden Regionen aufwiesen (Tab. A6).

#### 4.2.2 Hohe Konkordanz der TRST zur PCR-Ribotypisierung

Die Typisierbarkeit von *C. difficile* und das Diskriminierungsvermögen der beiden Wiederholungssequenzen wurden im Vergleich zum gegenwärtig in Europa eingesetzten Standardtypisierverfahren von *C. difficile*, der PCR-Ribotypisierung, anhand einer internationalen Stammsammlung von 154 Isolaten evaluiert. Die Stämme umfassten insgesamt 75 verschiedene PCR-Ribotypen und wurden hinsichtlich einer maximalen Diversität basierend auf der Verteilung der PCR-Ribotypen und der geographischen Herkunft zusammengestellt (Tab. A6)

Die beiden Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 ließen sich zwar aus allen 154 Isolaten amplifizieren, was einer Typisierbarkeit von 100 % entsprach, besaßen aber ein im Vergleich zur Ribotypisierung geringeres Diskriminierungsvermögen. Basierend auf dem Längen- und Sequenzpolymorphismus konnten insgesamt nur 43 unterschiedliche Sequenztypen für die Region TR6 ( $DI = 0,93$ ) und 53 für die Region TR10 ( $DI = 0,95$ ) unterschieden werden, gegenüber 75 PCR-Ribotypen ( $DI = 0,97$ , Tab. 3.5). Dahingegen führte die Verknüpfung der TR6 und TR10 Sequenzen zur Diskriminierung von 72 unterschiedlichen Sequenztypen, bei einem im Vergleich zur PCR-Ribotypisierung identischen Diskriminatorischen Index von 0,97 (Tab. 3.5). Aufgrund der Zusammensetzung der Stammsammlung, der eine hohe Ribotypdiversität als Auswahlkriterium für die Isolate zur Grunde lag, kann aber davon ausgegangen werden, dass das Diskriminierungsvermögen zu Gunsten der PCR-Ribotypisierung verschoben ist. Viele Ribotypen wurden in der Stammsammlung nur durch ein einziges Isolat repräsentiert und die potentielle Fähigkeit der Wiederholungsequenzen, diese weiter zu diskriminieren, konnte deshalb nicht untersucht werden.

Die kombinierte Sequenzanalyse der repetitiven Regionen TR6 und TR10 führte zur Etablierung eines neuen Typisierverfahrens für *C. difficile*, der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST) (Zaiß *et al.*, 2009). Die TRST und PCR-Ribotypisierung wiesen nicht nur eine hohe Übereinstimmung in der Diskriminierungsfähigkeit sondern auch in der Art und Weise der Typzuweisung auf. So konnte für die Anzahl untersuchter Stämme eine Gesamt-Konkordanz

beider Methoden von 89,8 % (bereinigter Rand Index 0,898) ermittelt werden (Tab. 3.5); die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unabhängige Isolate mit identischem Ribotyp ebenso einen identischen TRST-Sequenztyp aufweisen würden, entsprach 89,6 % (Wallace Index 0,896). Dementsprechend konnte den meisten Ribotypen ein spezifischer TRST-Sequenztypen zugewiesen werden (Abb. 3.6, Tab. A6).

So besaßen zum Beispiel 18 Isolate des Ribotyps 027 aus sechs unterschiedlichen europäischen Ländern den spezifischen TRST-Sequenztyp tr-027, der diese Isolate von allen bisher untersuchten anderen Ribotypen diskriminiert (Abb. 3.6, Tab. A6). Aufgrund der Assoziation des Ribotyp 027 mit einer erhöhten Virulenz von *C. difficile* Infektionen und zahlreichen Ausbrüchen weltweit ist die Identifizierung aus epidemiologischer Sicht besonders bedeutsam (Kuijper *et al.*, 2008; Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005).

Auch Toxin A-negativen, Toxin B-positiven Stämmen des Ribotyps 017, die ebenfalls mit einer hohen Ausbreitungsfähigkeit und schweren Krankheitsverläufen weltweit in Verbindung gebracht wurden, konnte ein spezifischer Sequenztyp (tr-017) zugewiesen werden (al-Barrak *et al.*, 1999; Drudy *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Kuijper *et al.*, 2001; Pituch *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2004). Zukünftige Studien mit einer größeren Anzahl an Isolaten müssen zeigen, ob möglicherweise zur Identifizierung epidemischer Stämme die Sequenzierung einer der beiden Wiederholungsregionen ausreicht. Im Sinne der Konkordanz zur PCR-Ribotypisierung und damit auch der Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Studien wäre aber die Sequenzierung beider Regionen erforderlich.

#### 4.2.3 Hohe Konkordanz der TRST zur Phylogenie von *C. difficile*

In einigen Fällen konnten Abweichungen in der Diskriminierung der TRST und PCR-Ribotypisierung registriert werden, wo Isolaten eines Ribotyps unterschiedliche TRST-Sequenztypen zugewiesen oder verschiedene Ribotypen zu einem Sequenztyp zusammengefasst wurden. Um zu überprüfen, inwieweit diese Unterschiede der Phylogenie des Erregers entsprechen, wurden betroffene Isolate mit der Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) charakterisiert, welche die Sequenzdiversität von sieben neutral evolvierenden Haushaltsgenen analysiert.

Dabei konnte gezeigt werden, dass in all den Fällen, in denen Isolate verschiedener Ribotypen einen identischen TRST-Sequenztyp aufwiesen, ein enges verwandtschaftliches Verhältnis der Isolate bestand (Abb. 3.7). So wurden beispielsweise Isolate der Ribotypen 070, 152 und

057 neben dem identischen TRST-Sequenztyp tr-048 ebenfalls durch den gemeinsamen MLST-Sequenztyp ST-13 klassifiziert. An sich war es aufgrund der hohen Konkordanz zur MLST (Rand Index = 0,96) möglich, über Clusteranalysen der Wiederholungssequenzen die Phylogenie von *C. difficile* korrekt abzubilden. Zum Beispiel konnten die Ribotypen 027, 156 und 019 durch einen hohen Verwandtschaftsgrad basierend auf identischen (ST-44) oder verwandten (ST-45) MLST-Sequenztypen charakterisiert werden (Abb. 3.7). Eine enge Verwandtschaft zwischen den Ribotypen 027 und 019 wurde auch durch die *Sma*I-Makrorestriktionsmusteranalyse ermittelt, wo beiden Ribotypen der Nord Amerikanische Pulsotyp (NAP) 1 zugeordnet wurde (Killgore *et al.*, 2008). Analog zur MLST und Makrorestriktionsmusteranalyse wiesen Isolate dieser Ribotypen auch ähnliche Sequenzen in den Wiederholungsregionen der TRST auf, welche zusammen im phylogenetischen Dendrogramm gruppiert wurden (Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu wichen die Bandenmuster der PCR-Ribotypen 027, 019 und 156 deutlich voneinander ab, weshalb es ist mit Hilfe der PCR-Ribotypisierung nicht immer möglich ist, auf Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate zu schließen (Abb. 3.8). Die phylogenetische Beziehung von Isolaten wurde ebenso in den Fällen deutlich, in denen TRST ein stärkeres Diskriminierungsvermögen als die PCR-Ribotypisierung aufwies. So konnte gezeigt werden, dass im Fall der Subdifferenzierung eines Ribotyps wie zum Beispiel der Ribotypen 001, 087 und 117 die Stämme immer noch aufgrund eines hohen Verwandtschaftsgrads der TRST-Regionen eng im phylogenetischen Baum gruppiert wurden und die Cluster deshalb mit dem jeweiligen Ribotyp und MLST-Typ korreliert werden konnten. Die Konkordanz zur Ribotypisierung im Fall einer stärkeren Diskriminierung ist besonders wichtig, damit bei einem Methodenwechsel die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden kann und somit die Kontinuität bestehender Surveillance-Programme oder epidemiologischer Studien erhalten bleibt.

Um phylogenetische Zusammenhänge auch innerhalb eines MLST-Sequenztyps genauer untersuchen zu können, wurden die Isolate zusätzlich mit Hilfe der *Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) typisiert. Die MLVA besitzt aufgrund der hohen Variabilität der sieben Wiederholungssequenzen das gegenwärtig höchste Diskriminierungsvermögen etablierter Typisierverfahren für *C. difficile* (Killgore *et al.*, 2008). Dadurch ist die MLVA in der Lage, Isolate eines Ribotyps oder MLST-Sequenztyps weiter zu diskriminieren und konnte dazu beitragen, epidemiologische Zusammenhänge von CDI Ausbrüchen innerhalb eines Krankenhauses und zwischen verschiedenen Institutionen aufzuklären (Drudy *et al.*, 2008; Fawley *et al.*, 2008; Fenner *et al.*, 2008; Marsh *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2007).

Allerdings lieferte die MLVA in unserer Stammsammlung nur wenige Einblicke in die Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate, da sich fast alle Stämme in mindestens vier MLVA-Regionen voneinander unterschieden, selbst wenn diese durch identische MLST-Sequenztypen, PCR-Ribotypen oder TRST-Typen klassifiziert worden sind (Abb. 3.7). Nur in drei Ausnahmen wiesen Isolate identische Allele in fünf der sieben MLVA Wiederholungssequenzen auf; die STRD (engl. *summed tandem repeat difference*) lag in zwei Fällen unter einem Grenzwert von  $\leq 10$ , was eine hohe genetische Verwandtschaft indiziert (Marsh *et al.*, 2006).

Dabei konnte aber nur in einem Fall, zwei Isolate aus Stuttgart (JW611148) und Tübingen (CL39) betreffend, die enge Verwandtschaft über identische MLST-Sequenztypen (ST-41) und einheitliche Sequenzen in den TRST-Markern TR6 und TR10 (tr-070) bestätigt werden (Abb. 3.7). In den anderen beiden Fällen wiesen die entsprechenden Isolate (AB403/CL45, NCTC11204/P5732) deutliche Unterschiede im Allelprofil der MLST und auch den Wiederholungssequenzen der TRST auf (Abb. 3.7), weshalb von der konvergenten Evolution identischer Kopienzahlen in den MLVA Wiederholungssequenzen ausgegangen werden kann. Die schnelle Evolution der MLVA-Regionen und damit die Gefahr zufälliger Ähnlichkeiten durch Homoplasie machen deutlich, dass das gegenwärtig verwendete MLVA-Schema ungeeignet ist, um phylogenetische Beziehungen entfernt verwandter Isolate korrekt abzubilden. Die hohe Variabilität der MLVA setzt die Vorcharakterisierung der Isolate mit weniger diskriminierenden Typisierverfahren voraus, damit phylogenetische Zusammenhänge erkennbar bleiben (Fawley *et al.*, 2008; Killgore *et al.*, 2008; Marsh *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2007).

Da es aufgrund der hohen Konkordanz der TRST zur MLST möglich war, mit Hilfe von Clusteranalysen der TRST-Sequenzen die Phylogenie des Erregers abzubilden, und im Gegensatz dazu phylogenetische Untersuchungen anhand von Bandenmustern der PCR-Ribotypisierung schwierig sind, wäre eine kombinierte Typisierung von TRST und nachfolgender MLVA in den Fällen sinnvoll, wo eine hohe Prävalenz eines Erregertyps eine stärkere Diskriminierung zur Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge erfordert. Die genauen phylogenetischen Zusammenhänge im Fall einer Subdifferenzierung eines MLST-Sequenztyps bleiben aber solange unklar, bis zusätzliche phylogenetische Marker wie genomweite Einzelnukleotidpolymorphismen vorliegen, welche eine verlässliche Untersuchung der evolutionären Geschichte von *C. difficile* auch innerhalb eines MLST-Sequenztyps erlauben (Achtman, 2008; Nübel *et al.*, 2008; Nübel *et al.*, 2010).

#### 4.3.4 Ausblick zur molekularen Typisierung von *C. difficile*

Eine molekulare Typisierung von *C. difficile* ist erforderlich, um die Verbreitung epidemischer Erregervarianten zu erfassen und einer weiteren Ausbreitung entgegenwirken zu können. Aufgrund der Subjektivität in der Auswertung und damit schlechten Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist zu erwarten, dass das gegenwärtige Standardverfahren, die PCR-Ribotypisierung, in Zukunft durch ein DNA-Sequenz-basiertes Verfahren ersetzt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte über die DNA-Sequenzanalyse der zwei vergleichsweise schnell evolvierenden Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 ein neues Typisierverfahren für *C. difficile* entwickelt werden, die Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung (TRST). Da die TRST über eine exzellente Konkordanz zur PCR-Ribotypisierung bei gleicher Diskriminierungsfähigkeit verfügt, würde im Fall eines Methodenwechsels die Vergleichbarkeit laufender Studien gewährleistet. Weiterhin ist die TRST durch eine hohe Übereinstimmung mit der Multilokus-Sequenz-Typisierung in der Lage, weitgehend die klonale Populationsstruktur und Phylogenie von *C. difficile* korrekt abzubilden. Dadurch stellt die TRST ein geeignetes Verfahren für die Typisierung von *C. difficile* dar, welches die Diskriminierung unabhängiger Isolate einschließlich ausbruchsrelevanter Epidemiestämme des Ribotyps 027 ermöglicht.

Die Sequenzdaten sind dabei leicht in einer öffentlich zugänglichen Datenbank hinterlegbar, wodurch reproduzierbar eindeutige Typen auch ohne den Austausch von Referenzstämmen festgelegt werden können. Dies wird in Zukunft die dezentrale Typisierung von *C. difficile* in breit angelegten, internationalen Studien ermöglichen und erheblich zum Wissen über die Verteilung und Diversität von *C. difficile* in der Gesamtpopulation beitragen.

Bisher ist das Verständnis der Populationsbiologie und Pathogenität von *C. difficile* allerdings sehr eingeschränkt, so dass noch geklärt werden muss, inwieweit die Diversität der Typisierungsergebnisse auch der Epidemiologie *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen entsprechen kann (Killgore *et al.*, 2008; Lemee *et al.*, 2004; Lemee *et al.*, 2005; Marsh *et al.*, 2006). Langfristig gesehen müssen deshalb Studien, die neben Krankenhaus-assoziierten Ausbruchsisolaten auch Stämme asymptomatischer Träger einschließen, zeigen, inwieweit Cluster der TRST in der Lage sind, die Epidemiologie und Klinik von *C. difficile* Infektionen zu reflektieren. Weiterhin werden umfassende Mutations- und vergleichende Genomanalysen helfen abzuschätzen, in welchem Umfang molekulare Typisierverfahren, die nur einen geringen Anteil des Genoms einer Spezies repräsentieren, die Populationsgenetik und Phylogenie eines Erregers erfassen können.

### 4.3 Mikroevolution und Phylogeographie des *C. difficile* Ribotyps 027

Seit 2001 wird weltweit über Ausbrüche und die Verbreitung des *C. difficile* PCR-Ribotyps 027 berichtet (Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2009), obwohl retrospektive Analysen historischer Stammsammlungen aus Frankreich, Schweden, den USA und Deutschland zeigen konnten, dass Isolate des Ribotyps bereits weit vor den ersten registrierten Ausbrüchen verbreitet waren (Ilchmann *et al.*, 2010; Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2009; Popoff *et al.*, 1988). Infolgedessen stellte sich die Frage, ob die derzeit in unterschiedlichen Ländern beobachteten Epidemien die klonale Ausbreitung eines neuen, erfolgreichen Stammes des Ribotyps repräsentieren oder stattdessen auf die lokale Verbreitung verschiedener Stämme zurückzuführen sind, welche durch bisher etablierte Typisierverfahren nicht diskriminiert werden können.

Um den Wandel der Epidemiologie von *C. difficile* verstehen zu können, ist die Aufklärung der genetischen Populationsstruktur des Erregers entscheidend. Die genetische Populationsstruktur in Form eines robusten Stammbaumes stellt dabei das Bezugssystem dar, gegen welches genetische Unterschiede und/oder Erregerphänotypen korreliert und Rückschlüsse auf epidemiologisch bedeutende Stammeigenschaften und die evolutionäre Geschichte der Ausbreitung gezogen werden können.

#### 4.3.1 *Clostridium difficile* Stämme des Ribotyps 027 sind genetisch hoch konserviert

Zur Rekonstruktion der Populationsstruktur des Ribotyps 027 wurde die Sequenzdiversität in 283 Haushaltsgenen innerhalb einer repräsentativen Stammsammlung von 60 internationalen Isolaten analysiert. Da Haushaltsgene ubiquitär verbreitet für essentielle Enzyme des Energie- und Baustoffwechsels kodieren, unterliegen diese Gene einer neutralen Evolution und stellen geeignete phylogenetische Marker dar. Genomweite Analysen neutraler Mutationen in Haushaltsgenen fanden bereits Anwendung in Untersuchungen zur Phylogenie und Mikroevolution bedeutender Krankheitserreger wie *S. aureus* (Nübel *et al.*, 2008; Nübel *et al.*, 2010), *Salmonella* Typhi (Roumagnac *et al.*, 2006) und *Bacillus anthracis* (Pearson *et al.*, 2004).

Die 283 Genabschnitte lieferten Sequenzinformation über 127 kb, was einer Abdeckung von ungefähr 3 % des 4,3 Mb großen *C. difficile* Genoms entsprach (Tab. A7). Gene in unmittelbarer Nähe zu mobilen genetischen Elementen oder Virulenz-assoziierten Determinanten wurden aus dem Datensatz entfernt, um den Einfluss positiver Selektion über eine genetische

Kopplung ausschließen zu können. Die 60 internationalen *C. difficile* Isolate des Ribotyps 027 stammten aus sieben unterschiedlichen Ländern, schlossen die drei Kontinente Nordamerika, Europa und Asien ein und umfassten eine Zeitspanne von 1990 bis 2008 (Tab A8). Trotz der Zeitspanne von 18 Jahren und der internationalen Herkunft konnte aber nur ein einziger Polymorphismus in zwei amerikanischen Isolaten (USA 2, 3 – Tab. A8) identifiziert werden.

Die daraus abgeleitete Nukleotiddiversität ( $\pi$ ) spiegelte mit  $1,3 \times 10^{-7}$  eine im Vergleich zum Methicillin-resistenten *S. aureus* ST225 ( $1 \times 10^{-5}$ ) 80mal geringere Diversität wieder (Nübel *et al.*, 2010). Gründe für eine geringe Diversität können in einem jungen Ursprung und der damit verbundenen kurzen Zeit liegen, Mutationen zu akkumulieren. Da der MRSA ST225 aber ähnlich wie der *C. difficile* Ribotyp 027 erstmals 1990 in Nordamerika identifiziert werden konnte und momentan über Europa expandiert, beide Spezies also eine ungefähr gleiche evolutionäre Zeitspanne umschließen, sprechen die Ergebnisse stattdessen für eine sehr langsame Evolutionsrate von *C. difficile*. Gründe für die langsame Evolution können in einer geringen Mutationsrate (Fehlerrate der DNA-Polymerase), einer langen durchschnittlichen Generationszeit oder anderen Populationsparametern (effektive Größe der Population, Selektion, Gendrift) liegen. Im Gegensatz zu *S. aureus* wurde für *C. difficile* bisher keine Mutationsrate, also die Mutationshäufigkeit pro Generation, bestimmt. Da beide Organismen aber identische Mutationsfrequenzen von  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  bei der Ausbildung von Gyrase Mutationen und assoziierter Levofloxacinresistenz besitzen (Critchley *et al.*, 2009; Gilbert *et al.*, 2001), ist zu vermuten, dass die geringe Evolutionsrate mit der Lebensweise und Biologie von *C. difficile* zusammenhängt. Eine Erklärung könnte in der Dormanz der Spore liegen, welche die DNA vor Replikationsfehlern und dem Einfluss mutagener Agenzien schützt. Aufgrund der geringen Diversität des Kerngenoms von *C. difficile* ist weder eine Rekonstruktion der phylogenetischen Populationsstruktur noch ein Einblick in die evolutionärgeschichtliche Entwicklung des Ribotyps 027 anhand der durchgeführten Mutationsanalyse möglich.

#### 4.3.2 Ausbreitung einer neuen Linie des *C. difficile* Ribotyps 027

Um trotz der Konserviertheit des Kerngenoms von *C. difficile* erste Rückschlüsse über die Mikroevolution des Ribotyps 027 ziehen zu können, wurden die Isolate zusätzlich mit Hilfe der MLVA genotypisiert. Da es anhand des Isolationsdatums nicht möglich ist, aktuelle Genotypen des Ribotyps von noch persistierenden, historischen zu unterscheiden, sind die Isolate außerdem auf die Anwesenheit von Markern untersucht worden, die in Studien als spezifisch

für aktuelle Ausbruchsisolate definiert und nicht in Isolaten vor 2001 nachgewiesen werden konnten.

Ein phänotypischer Marker, dessen Verbreitung sich mit der steigenden Inzidenz epidemischer Ribotyp 027 Isolate deckt und nicht in historischen Stämmen nachgewiesen wurde, ist die Fluorchinolonresistenz (Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005). Die Exposition gegenüber Fluorchinolonen ist in zahlreichen Studien als unabhängiger Risikofaktor für die Verbreitung des Ribotyps definiert worden (Gaynes *et al.*, 2004; Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; Muto *et al.*, 2005; Pepin *et al.*, 2005), wobei neben unseren Untersuchungen in Abschnitt 3.1.3 auch andere Studien zeigen konnten, dass die Resistenz ebenfalls in nicht-epidemischen Ribotypen weit verbreitet und aufgrund eines Selektionsdruckes leicht induziert werden kann (Deneve *et al.*, 2009; Saxton *et al.*, 2009). Weiterhin wurde die Verbreitung von zwei Genen analysiert, die durch vergleichende Genomanalysen des englischen Stammes R20291 von 2006 und französischen Stammes CD196 von 1985 als spezifisch für das mobile Element CTnCD5b des aktuellen Ausbruchstammes definiert worden sind (He *et al.*, 2010; Stabler *et al.*, 2009).

Das mobile Element CTnCD5b setzt sich aus dem konjugativen Transposon CTnCD5, dessen in den konjugativen Transfer involvierten Gene eine hohe Verwandtschaft mit dem Transfermodul des Transposons Tn1549 von *Enterococcus faecalis* aufweisen (Garnier *et al.*, 2000; He *et al.*, 2010; Sebaihia *et al.*, 2006) sowie einem in die Rekombinase (CDR20291\_1744) integrierten 20 kb großen Prophagen SMPI (engl. *Stoke Mandeville Page Island 1*) zusammen. Obwohl die meisten ORFs keine Homologien zu bekannten Pathogenitätsfaktoren aufzeigen, kodiert CTnCD5b für eine Reihe akzessorischer Gene, die im Zusammenhang mit antimikrobieller Resistenz (hypothetische rRNA-Methyltransferase, ABC-Transporter für Lantibiotika) und Metabolittransport stehen und eine mögliche Rolle in der Virulenz und Ausbreitungsfähigkeit aktueller Ribotyp 027 Isolate spielen könnten.

Als Markergene fungierten der ORF eines hypothetischen ABC-Transporters für Lantibiotika (CDR20291\_1752) und ein putatives Regulationsproteins eines Zweikomponentensystems (CDR20291\_1775). Obwohl in der Studie von Stabler *et al.*, 2009 gezeigt werden konnte, dass beide Gene hoch prävalent in aktuellen amerikanischen Ribotyp 027 Stämmen der Jahre 2001 bis 2004 waren und kein Nachweis in historischen Isolaten von 1988 bis 1995 erfolgte, war der hypothetische ABC-Transporter in unserem Datensatz von geringer epidemiologischer Bedeutung, da weder aktuelle deutsche noch kanadische Isolate diesen Marker aufwiesen. Dabei ist festzuhalten, dass sich auch in den aktuellen amerikanischen Stämmen zwei



weitere Gene des Transposons neben dem ORF CDR20291\_1752 nicht amplifizieren ließen, was für einen heterogenen Aufbau der Region spricht (Stabler *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zum Transporter ließ sich das hypothetische Regulationsprotein (CDR20291\_1775) aus einer Vielzahl aktueller Isolate amplifizieren, wohingegen keines der vor 2001 asservierten Isolate den Marker aufwies. *Minimum-Spanning* Clusteranalysen der MLVA-Profile konnten zeigen, dass die Verbreitung dabei mit der Fluorchinolonresistenz korreliert (Abb. 3.9 – B, C). Basierend auf der Verteilung der Marker zeichneten sich im Stammbaum drei große Bereiche ab. Resistente Isolate mit positiver Amplifikation des ORFs CDR20291\_1775 wurden fast ausschließlich Cluster I zugeordnet, während sich sensible Stämme ohne den ORF auf die Linien II und III verteilten (Abb. 3.9).

Cluster I beinhalte nur internationale Stämme, die nach 2005 isoliert worden sind. Über die Korrelation der MLVA-Ergebnisse mit der geographischen Herkunft konnte gezeigt werden, dass aktuelle deutsche Isolate mit epidemischen kanadischen eine Verwandtschaft aufwiesen, was für die globale Ausbreitung des Ribotyps 027 spricht. Die 16 aktuellen deutschen Isolate aus 12 unterschiedlichen Städten zeigten dabei eine Radiation ausgehend von Stämmen aus Stuttgart und Trier, was in Übereinstimmung mit den ersten detektierten Ausbrüchen in Deutschland steht und auf eine anschließende klonale Verbreitung hindeutet (Abb. 3.9) (Kleinkauf *et al.*, 2007; Zaiß *et al.*, 2007). Interessanterweise wurden sowohl aktuelle deutsche als auch kanadische Isolate in Cluster I deutlich (4 bis 5 unterschiedliche MLVA-Regionen) von historischen sowie aktuellen Fluorchinolonsensiblen, CDR20291\_1775 negativen Isolaten identischer Herkunft in den Linien II und III getrennt. Da diese beiden Linien zahlreiche historische Isolate beinhalteten, die weit vor den ersten bekannten Ausbrüchen 2001 asserviert worden sind, ist davon auszugehen, dass diese Äste des Dendrogramms eine historische Population des Ribotyps 027 repräsentieren. Wie anhand teilweise vorhandener aktueller Isolationsdaten ersichtlich, scheinen diese historischen Haplotypen noch oft in der aktuellen Population zu persistieren, zum Teil mit konvergent ausgebildeter Fluorchinolonresistenz. Dabei spielen diese Stämme aber keine Rolle in der momentanen Verbreitung des Ribotyps 027, wie anhand der nahen Verwandtschaft aktueller kanadischer und deutscher Isolate in Cluster I und der sehr heterogenen Clusterung hinsichtlich der geographischen Herkunft in den Linien II und III ersichtlich (Abb. 3.9). Aufgrund der schnellen Evolution einiger Wiederholungssequenzen und einer begrenzten Anzahl maximal verfügbarer Allele war es allerdings schwierig, die korrekte Phylogenie weit divergenter Linien mit Hilfe der MLVA abzuleiten, da konvergent entstandene Ähnlichkeiten (Homoplasie) in MLVA-Profilen aufgetreten sind (Abb. 3.10). Das Homoplasielevel in unserem Datensatz war sehr hoch (Homopla-

sie Index = 0,319; Retention Index = 0,738), so dass vor allem von einer Fehlgruppierung historischer Isolate ausgegangen werden kann.

Trotz alledem konnte die MLVA aber durch die Verwandtschaft aktueller kanadischer und deutscher Isolate und der Trennung zu historischen Haplotypen zeigen, dass die globale Verbreitung des Ribotyp 027 auf das Auftreten einer neuen Variante des Ribotyps zurückzuführen ist, welche, wenn man die Chronologie der detektierten Ausbrüche betrachtet, höchst wahrscheinlich in Nordamerika entstanden ist und sich nun weltweit ausbreitet. Ob eine direkte epidemiologische Verbindung zwischen kanadischen und deutschen Isolaten existiert, kann aufgrund der limitierten Stammsammlung nicht geklärt werden. Weitere Isolate vor allem aus europäischen Anrainerstaaten müssten in den Datensatz aufgenommen werden, um präziser die Geschichte der Ausbreitung des Ribotyps 027 in Deutschland verfolgen zu können.

#### 4.3.3 Genomanalysen betätigen die Evolution unterschiedlicher Linien des Ribotyps 027

Zur Aufklärung der evolutionären Entstehungsgeschichte sowie der Kräfte, die zur Fitness und globalen Ausbreitung des *C. difficile* Ribotyps 027 beitragen, sind höher auflösende Verfahren wie die Sequenzierung und Re-Sequenzierung ganzer Genome notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom eines 1990 isolierten Ribotyp 027 Isolats aus Hamburg (D22) sequenziert und mit bereits publizierten Genomsequenzen des Ribotyps verglichen. Insgesamt wurde eine Sequenzidentität von 99,2 % im Vergleich zum bisher ältesten asservierten Ribotyp 027 Isolat, dem französischen Stamm CD196 von 1985, ermittelt. Im Gegensatz zum französischen Stamm und aktuellen Isolaten des Ribotyps 027 konnte ein 45 kb großer Prophage ( $\Phi$ -CDBI1) im Genom des deutschen Stammes identifiziert werden, dessen kodierende Bereiche aber keine Homologien zu bekannten Virulenzfaktoren aufwiesen. Dieser Bakteriophage wurde ebenfalls bei einem historischen amerikanischen Stamm von 1988 (BI-1) nachgewiesen (He *et al.*, 2010), was zeigt, dass es entweder bereits in der Vergangenheit zu einem internationalen Austausch von *C. difficile* Stämmen gekommen sein muss oder es sich alternativ um einen weit verbreiteten, temperenten Phagen handelt.

Zur Aufklärung der Phylogenie des Ribotyps 027 wurden Einzelnukleotidpolymorphismen im nicht-rekombinierten Kerngenom des deutschen Isolats detektiert und mit 22 internationalen Ribotyp 027 Stämmen verglichen, die eine Zeitspanne von 1985-2007 umschlossen (He *et al.*, 2010). Dabei konnte die geringe Diversität des *C. difficile* Ribotyps 027 bestätigt und insgesamt nur 132 SNPs identifiziert werden, was wieder für eine langsame Evolutionsrate von *C.*

*difficile* spricht. Zwei Drittel der Mutationen waren nicht-synonym und führten dadurch zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Da bei normalem Kodongebrauch drei Viertel der theoretisch möglichen Mutationen nicht-synonym sind und man ein entsprechendes Verhältnis bei neutraler Selektion ( $Ka/Ks = 1$ ) erwarten würde, deutet der geringere Anteil in unserem Datensatz auf die stabilisierende Selektion des Kerngenoms von *C. difficile* hin (Nübel *et al.*, 2008). Dabei muss aufgrund des geringen Guanin-Cytosin Gehaltes des *C. difficile* Genoms (29 %), welcher die Anzahl verfügbarer Kodons und damit theoretisch möglicher synonyme Substitutionen reduziert, an sich von einem höheren normalisierten Verhältnis nicht-synonymer zu synonymen Mutationen ausgegangen werden, was die stabilisierende Selektion unterstreicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit Analysen von He *et al.*, 2010, die eine sehr starke stabilisierende Selektion im Kerngenom weit divergierender *C. difficile* Linien unterschiedlicher Ribotypen nachweisen konnten (durchschnittliches Verhältnis  $Ka/Ks$  zwischen dem Ribotyp 078 und den Ribotypen 017, 001, 012 und 027 = 0,08). Nah verwandte Linien wiesen dagegen ein höheres Verhältnis auf, was an der geringeren Zeit für die Selektion liegt, leicht schädliche Mutationen aus der Population zu entfernen (Rocha *et al.*, 2006). Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass bei expandierenden, wandernden Populationen wie der des Ribotyps 027 genetische Drift eine größere Rolle spielt und, unabhängig von der Fitness, schädliche Mutationen länger im Genpool verbleiben („Gründereffekt“).

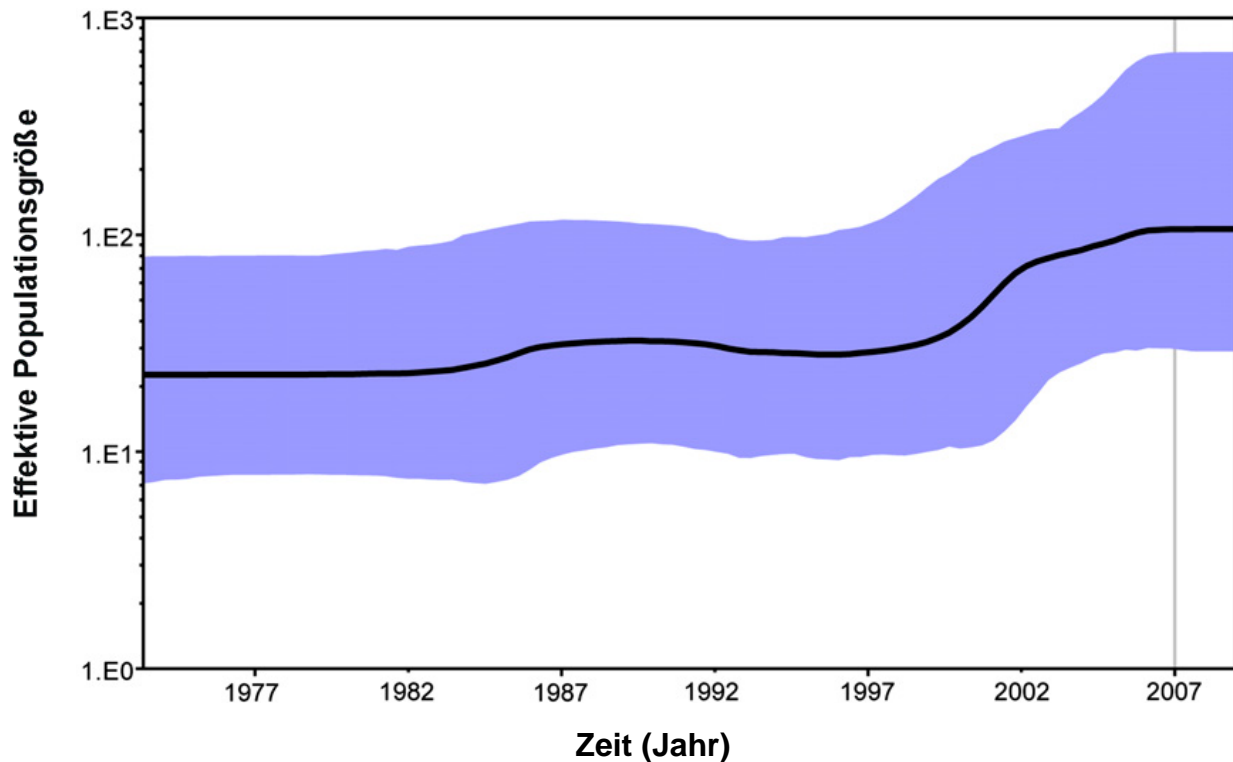
Phylogenetische Clusteranalysen basierend auf den identifizierten SNPs konnten einen hohen Grad an Verwandtschaft historischer Stämme aus Deutschland, Frankreich und den USA aufzeigen, was die Annahme eines internationalen Austausches bestätigt (Abb. 3.13 – Cluster A). Ein aktuelles amerikanisches Isolat von 2007 (2007218) fiel ebenfalls in dieses Cluster, wobei der Stamm eine identische Sequenz im Kerngenom im Vergleich zum historischen amerikanischen Stamm BI-2 von 1991 und nur drei SNPs Unterschied zum französischen Stamm CD196 aufwies. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen historischen Genotyp handelt, der noch in der aktuellen Population persistiert.

Historische Stämme, die vor den ersten bekannten Ausbrüchen asserviert worden sind, konnten im Stammbaum von aktuellen amerikanischen und einem britischen Ausbruchstamm (R20291) diskriminiert werden (Abb. 3.13). Die aktuellen Isolate wiesen dabei eine heterogene Clusterung auf, welche aufgrund fehlender epidemiologischer Daten (schwere der Erkrankung, Ausbruchsgeschehen, sporadischer Fall) schwer zu interpretieren ist. Wegen der insgesamt geringen Diversität und dadurch bedingten Sensitivität gegenüber Sequenzierfehlern oder verbliebenen rekombinierten Regionen können auch Fehlgruppierungen nicht ausgeschlossen werden.

Untersuchungen von He *et al.*, 2010 konnten zeigen, dass alle aktuellen Stämme in den Clustern B und C im Gegensatz zu historischen Isolaten in Cluster A eine Kopie des Transposons CTnCD5 aufwiesen, wobei bei vier Stämmen des Clusters C (2004102, BI-13, 2006439, 2007855) zusätzlich eine 7,5 kb große Aminoglycosidresistenzkassette integriert war. Zwei dieser Stämme (2006439, 2007855) stammten aus Proben tierischer Herkunft, so dass über eine Adaptation an ein animalisches Habitat und eine zoonotische Verbreitung der Stämme spekuliert werden kann. Des Weiteren konnte mit Ausnahme des Isolats BI-7 in allen Stämmen des Clusters C ein weiteres Transposon (CTnCD11) nachgewiesen werden, welches für ein Makrolidresistenzgen (rRNA Adenin-N-6-methyltransferase) kodiert. Da aber Stämme des Clusters B ebenfalls über eine Resistenz gegen Erythromycin verfügen, kann die Akquirierung des Resistenzgens nicht der alleinige Selektionsvorteil und mögliche Grund für die Aufspaltung des Ribotyps sein. Aufgrund der Tatsache, dass in den meisten Fällen die mobilen genetischen Elemente von *C. difficile* bisher nicht weiter charakterisiert wurden und außer wenigen Ausnahmen keine Homologien zu bekannten Virulenzfaktoren existieren, müssen zukünftige Mutagenese-Experimente und geeignete *in vivo* Modelle eine Rolle in der Virulenz und Ausbreitungsfähigkeit des Ribotyps erst bestätigen.

Da *C. difficile* als Humanpathogen erst Ende der 1970er identifiziert werden konnte (Bartlett *et al.*, 1977; George *et al.*, 1978), phylogenetische Analysen auf Grundlage des Bayesianischen Verfahrens aber ein hohes Alter der Spezies *C. difficile* ergaben (1,1 bis 85 Millionen Jahre) (Drummond *et al.*, 2005; Drummond & Rambaut, 2007; He *et al.*, 2010), muss davon ausgegangen werden, dass vor allem anthropogene Einflüsse der letzten Jahrzehnte wie das Antibiotikaregime und Patientenmanagement in den Krankenhäusern die Selektion und Ausbreitung von *C. difficile* als Krankheitserreger beeinflusst haben.

Demographische Berechnungen bezogen auf die Populationsgröße des Ribotyps 027 konnten weiterhin bestätigen, dass seit Anfang des Jahrhunderts ein Populationswachstum zu verzeichnen ist, was sich mit den ersten registrierten Ausbrüchen 2001 und der Annahme einer anschließenden Verbreitung deckt (Abb. 4.1).



**Abb. 4. 1:** Entwicklung der effektiven Populationsgröße des *C. difficile* Ribotyps 027 über die Zeit. Die schattierte Fläche stellt das Konfidenzintervall (95 %) dar. Abbildung entnommen aus He *et al.*, 2010.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass es bereits vor 2001 zu einem internationalen Austausch von *C. difficile* des Ribotyps 027 gekommen sein muss und sich ausgehend von einer historischen Population neue Linien des Ribotyps 027 ausgebildet haben. Inwieweit die gegenwärtige Ausbreitung des Ribotyps 027 auf eine oder mehrere dieser Linien zurückzuführen ist, kann dadurch, dass bislang mit Ausnahme des englischen Stammes R20291 nur aktuelle amerikanische Isolate in den Datensatz aufgenommen worden sind, nicht eindeutig geklärt werden. Weitere internationale Ausbruchsisolate müssten in den Datensatz integriert werden, um detaillierte Rückschlüsse zur Ausbreitung und Mikroevolution des Ribotyps 027 ziehen zu können.

#### 4.3.4 Ausblick zur Analyse der Mikroevolution des *C. difficile* Ribotyps 027

Obwohl in den letzten 10 Jahren weltweit ein starker Anstieg der Inzidenz *C. difficile*-assoziierter Erkrankungen zu verzeichnen war, konnte der Beitrag, den epidemisch verbreitete Erregervarianten an der Zunahme der Infektionen tragen, bisher nicht eindeutig geklärt werden. Während in Nordamerika über gestiegene Morbiditäts- und Mortalitätsraten nach Infek-

tionen mit dem *C. difficile* Ribotyp 027 berichtet wurde (Hubert *et al.*, 2007; Loo *et al.*, 2005), mehren sich vor allen in Europa Studien, in denen eine erhöhte Virulenz des Ribotyps nicht signifikant bestätigt werden kann (Cloud *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2010). Da die Diskrepanzen oftmals auf ein mangelndes Studiendesign zurückzuführen sind, müssen zukünftige Studien anhand statistisch ausreichender Fallzahlen sowie entsprechender Kontrollgruppen mögliche Virulenzunterschiede erst bestätigen.

Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich, wie in unseren Ergebnissen angedeutet, divergierende Linien des Ribotyp ausgebreitet haben, die möglicherweise Unterschiede in der Pathopotenzen aufweisen. Einen erheblichen Fortschritt im Verständnis der Ausbreitung des Ribotyps 027 ist in den nächsten Jahren durch die Ausweitung der Populationsgenomik zu erwarten (Maiden, 2008; Nübel *et al.*, 2010; Parkhill, 2008; Wilson *et al.*, 2005). Die Sequenzierung einer repräsentativen Stichprobe der Population wird die präzise Charakterisierung der genetischen Diversität des Ribotyps ermöglichen, und die Diversität in einem evolutionären, ökologischen sowie populationsgenetischen Kontext zu interpretieren sein. Entscheidend ist, dass nicht nur Isolate aus Infektionsverläufen in den Datensatz integriert werden, da *C. difficile* als sehr alte Spezies erst seit wenigen Jahrzehnten mit Krankheiten beim Menschen assoziierbar ist und entsprechend ein verfälschtes Bild der Populationsstruktur abgebildet werden würde.

Durch den Vergleich dieser Stämme können in Zukunft detailliert Einblicke in die evolutionäre Entstehungsgeschichte sowie räumliche und zeitliche Dynamik der Population gewonnen und die Kräfte ermittelt werden, welche zur Diversität und damit Gestaltung der Populationsstruktur von *C. difficile* beigetragen haben. Mutagenese-Experimente und geeignete *in vivo* Modelle werden dabei helfen aufzuklären, ob und in welchem Umfang genetische Unterschiede zu einer erhöhten Virulenz bestimmter Linien beitragen, und die Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren wird langfristig gesehen neue Therapieansätze der oft rekurrent verlaufenden *C. difficile* Infektionen ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- Achtman, M. (2008).** Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* **62**, 53-70.
- Ackermann, G., Tang, Y. J., Kueper, R., Heisig, P., Rodloff, A. C., Silva, J., Jr. & Cohen, S. H. (2001).** Resistance to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 2348-2353.
- Ackermann, G., Tang-Feldman, Y. J., Schaumann, R., Henderson, J. P., Rodloff, A. C., Silva, J. & Cohen, S. H. (2003).** Antecedent use of fluoroquinolones is associated with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* **9**, 526-530.
- Akerlund, T., Persson, I., Unemo, M., Noren, T., Svenungsson, B., Wullt, M. & Burman, L. G. (2008).** Increased sporulation rate of epidemic *Clostridium difficile* Type 027/NAP1. *Journal of clinical microbiology* **46**, 1530-1533.
- al-Barrak, A., Embil, J., Dyck, B., Olekson, K., Nicoll, D., Alfa, M. & Kabani, A. (1999).** An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. *Can Commun Dis Rep* **25**, 65-69.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Assefa, S., Keane, T. M., Otto, T. D., Newbold, C. & Berriman, M. (2009).** ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics* **25**, 1968-1969.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & other authors (2008).** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.
- Baines, S. D., Saxton, K., Freeman, J. & Wilcox, M. H. (2006).** Tigecycline does not induce proliferation or cytotoxin production by epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **58**, 1062-1065.
- Baines, S. D., O'Connor, R., Freeman, J., Fawley, W. N., Harmanus, C., Mastrantonio, P., Kuijper, E. J. & Wilcox, M. H. (2008).** Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **62**, 1046-1052.
- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmee, M., Brazier, J., Kuijper, E. & Poxton, I. (2007).** Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* **13**, 1048-1057.
- Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L. & Kasper, D. L. (1977).** Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis* **136**, 701-705.

- Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N. & Onderdonk, A. B. (1978).** Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* **75**, 778-782.
- Bartlett, J. G. (1979).** Antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Reviews of infectious diseases* **1**, 530-539.
- Bartlett, J. G. (2002).** Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England journal of medicine* **346**, 334-339.
- Bartlett, J. G. (2006).** Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* **145**, 758-764.
- Benson, G. (1997).** Sequence alignment with tandem duplication. *J Comput Biol* **4**, 351-367.
- Benson, G. (1999).** Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research* **27**, 573-580.
- Bidet, P., Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B. & Petit, J. C. (1999).** Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters* **175**, 261-266.
- Bidet, P., Lalande, V., Salauze, B., Burghoffer, B., Avesani, V., Delmee, M., Rossier, A., Barbut, F. & Petit, J. C. (2000).** Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* **38**, 2484-2487.
- Borgmann, S., Kist, M., Jakobiak, T., Reil, M., Scholz, E., von Eichel-Streiber, C., Gruber, H., Brazier, J. S. & Schulte, B. (2008).** Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. *Euro Surveill* **13**, pii: 19057 Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19057>.
- Brazier, J. S. (1998).** The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **41 Suppl C**, 47-57.
- Brazier, J. S. & Borriello, S. P. (2000).** Microbiology, epidemiology and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **250**, 1-33.
- Brazier, J. S., Patel, B. & Pearson, A. (2007).** Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in British hospitals. *Euro Surveill* **12**, E070426 070422.
- Brazier, J. S. (2008).** *Clostridium difficile*: from obscurity to superbug. *Br J Biomed Sci* **65**, 39-44.
- Brazier, J. S., Raybould, R., Patel, B., Duckworth, G., Pearson, A., Charlett, A. & Duerden, B. I. (2008).** Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Euro Surveill* **13**, pii: 19000. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19000>.



- Carrico, J. A., Silva-Costa, C., Melo-Cristino, J., Pinto, F. R., de Lencastre, H., Almeida, J. S. & Ramirez, M. (2006).** Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *Journal of clinical microbiology* **44**, 2524-2532.
- Carter, J. (2009).** Deaths involving *Clostridium difficile*: England and Wales, 2008. *Health statistics quarterly / Office for National Statistics*, 43-47.
- Chang, J. Y., Antonopoulos, D. A., Kalra, A., Tonelli, A., Khalife, W. T., Schmidt, T. M. & Young, V. B. (2008).** Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis* **197**, 435-438.
- Cloud, J., Noddin, L., Pressman, A., Hu, M. & Kelly, C. (2009).** *Clostridium difficile* strain NAP-1 is not associated with severe disease in a nonepidemic setting. *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**, 868-873 e862.
- Critchley, I. A., Green, L. S., Young, C. L. & other authors (2009).** Spectrum of activity and mode of action of REP3123, a new antibiotic to treat *Clostridium difficile* infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**, 954-963.
- Curry, S. R., Marsh, J. W., Muto, C. A., O'Leary, M. M., Pasculle, A. W. & Harrison, L. H. (2007).** tcdC genotypes associated with severe TcdC truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology* **45**, 215-221.
- Dallal, R. M., Harbrecht, B. G., Boujoukas, A. J., Sirio, C. A., Farkas, L. M., Lee, K. K. & Simmons, R. L. (2002).** Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. *Ann Surg* **235**, 363-372.
- Davey, P., Brown, E., Fenelon, L. & other authors (2006).** Systematic review of antimicrobial drug prescribing in hospitals. *Emerging infectious diseases* **12**, 211-216.
- Dawson, L. F., Valiente, E. & Wren, B. W. (2009).** *Clostridium difficile*--a continually evolving and problematic pathogen. *Infect Genet Evol* **9**, 1410-1417.
- Debast, S. B., van Leengoed, L. A., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E. J. & Bergwerff, A. A. (2009).** *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environmental microbiology* **11**, 505-511.
- Deneve, C., Bouttier, S., Dupuy, B., Barbut, F., Collignon, A. & Janoir, C. (2009).** Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 5155-5162.
- Dridi, L., Tankovic, J., Burghoffer, B., Barbut, F. & Petit, J. C. (2002).** gyrA and gyrB mutations are implicated in cross-resistance to Ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 3418-3421.
- Drudy, D., Harnedy, N., Fanning, S., Hannan, M. & Kyne, L. (2007).** Emergence and control of fluoroquinolone-resistant, toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**, 932-940.

- Drudy, D., Goorhuis, B., Bakker, D., Kyne, L., van den Berg, R., Fenelon, L., Fanning, S. & Kuijper, E. J. (2008).** Clindamycin-resistant clone of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027, Europe. *Emerging infectious diseases* **14**, 1485-1487.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O. G. (2005).** Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution* **22**, 1185-1192.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007).** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* **7**, 214.
- Eisen, J. (1999).** Mechanistic basis for microsatellite instability. In *DB Goldstein and C Schötterer (ed), Microsatellites: evolution and applications Oxford University Press, New York, NY*, 34-48.
- Elliott, B., Chang, B. J., Golledge, C. L. & Riley, T. V. (2007).** *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Intern Med J* **37**, 561-568.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. & Spratt, B. G. (2000).** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* **38**, 1008-1015.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. & Spratt, B. G. (2002).** The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7687-7692.
- Fawley, W. N., Underwood, S., Freeman, J., Baines, S. D., Saxton, K., Stephenson, K., Owens, R. C., Jr. & Wilcox, M. H. (2007).** Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**, 920-925.
- Fawley, W. N., Freeman, J., Smith, C., Harmanus, C., van den Berg, R. J., Kuijper, E. J. & Wilcox, M. H. (2008).** Use of highly discriminatory fingerprinting to analyze clusters of *Clostridium difficile* infection cases due to epidemic ribotype 027 strains. *Journal of clinical microbiology* **46**, 954-960.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. & Spratt, B. G. (2004).** eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* **186**, 1518-1530.
- Fenner, L., Widmer, A. F., Strandén, A., Conzelmann, M., Goorhuis, A., Harmanus, C., Kuijper, E. J. & Frei, R. (2008).** First cluster of clindamycin-resistant *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* **14**, 514-515.
- Frenay, H. M., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Verhoef, J. & Mooi, F. R. (1996).** Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**, 60-64.

- Gal, M., Northey, G. & Brazier, J. S. (2005).** A modified pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol for subtyping previously non-PFGE typeable isolates of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 001. *The Journal of hospital infection* **61**, 231-236.
- Garnier, F., Taourit, S., Glaser, P., Courvalin, P. & Galimand, M. (2000).** Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology (Reading, England)* **146** ( Pt 6), 1481-1489.
- Gaynes, R., Rimland, D., Killum, E., Lowery, H. K., Johnson, T. M., 2nd, Killgore, G. & Tenover, F. C. (2004).** Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use. *Clin Infect Dis* **38**, 640-645.
- George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R., Alexander-Williams, J. & Burdon, D. W. (1978).** Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *Br Med J* **1**, 695.
- Gilbert, D. N., Kohlhepp, S. J., Slama, K. A., Grunkemeier, G., Lewis, G., Dworkin, R. J., Slaughter, S. E. & Leggett, J. E. (2001).** Phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus*, selected Enterobacteriaceae, and *Pseudomonas aeruginosa* after single and multiple in vitro exposures to ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**, 883-892.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A., Dekker, F. W. & Kuijper, E. J. (2008).** Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* **47**, 1162-1170.
- Goorhuis, A., Legaria, M. C., van den Berg, R. J., Harmanus, C., Klaassen, C. H., Brazier, J. S., Lumelsky, G. & Kuijper, E. J. (2009).** Application of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis to determine clonal spread of toxin A-negative *Clostridium difficile* in a general hospital in Buenos Aires, Argentina. *Clin Microbiol Infect* **15**, 1080-1086.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M. & other authors (2009).** Multilocus Sequence Typing of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*.
- Grundmann, H., Hori, S. & Tanner, G. (2001).** Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *Journal of clinical microbiology* **39**, 4190-4192.
- Hall, I. C. & O'Tool, E. (1935).** Intestinal flora in new born infants. *Am J Dis Child* **31**, 390-402.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Turnwald, D. & Vogel, U. (2003).** Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of clinical microbiology* **41**, 5442-5448.
- Hatheway, C. L. (1990).** Toxigenic clostridia. *Clinical microbiology reviews* **3**, 66-98.

- Hawkey, P. M. (2003).** Mechanisms of quinolone action and microbial response. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51 Suppl 1**, 29-35.
- He, M., Sebaihia, M., Lawley, T. D. & other authors (2010).** Evolutionary dynamics of *Clostridium difficile* over short and long time scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7527-7532.
- Hooper, D. C. (1999).** Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* **2**, 38-55.
- Huang, H., Wu, S., Wang, M., Zhang, Y., Fang, H., Palmgren, A. C., Weintraub, A. & Nord, C. E. (2009).** *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *International journal of antimicrobial agents* **33**, 339-342.
- Hubert, B., Loo, V. G., Bourgault, A. M., Poirier, L., Dascal, A., Fortin, E., Dionne, M. & Lorange, M. (2007).** A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Quebec. *Clin Infect Dis* **44**, 238-244.
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988).** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology* **26**, 2465-2466.
- Ilchmann, C., Zaiß, N. H., Speicher, A., Christner, M., Ackermann, G. & Rohde, H. (2010).** Comparison of resistance against erythromycin and moxifloxacin, presence of binary toxin gene and PCR ribotypes in *Clostridium difficile* isolates from 1990 and 2008  
*Manuskript in Bearbeitung.*
- Jhung, M. A., Thompson, A. D., Killgore, G. E. & other authors (2008).** Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerging infectious diseases* **14**, 1039-1045.
- Jobb, G., von Haeseler, A. & Strimmer, K. (2004).** TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* **4**, 18.
- Johnson, S., Samore, M. H., Farrow, K. A. & other authors (1999).** Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *The New England journal of medicine* **341**, 1645-1651.
- Johnson, S. (2009).** Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches. *International journal of antimicrobial agents* **33 Suppl 1**, S33-36.
- Jones, R. L. (1989).** Diagnostic procedures for isolation and characterization of *Clostridium difficile* associated with enterocolitis in foals. *J Vet Diagn Invest* **1**, 84-86.
- Kaier, K., Luft, D., Dettenkofer, M., Kist, M. & Frank, U. (2010).** Correlations between bed occupancy rates and *Clostridium difficile* infections: a time-series analysis. *Epidemiol Infect*, 1-4.

- Karas, J. A., Enoch, D. A. & Aliyu, S. H. (2010).** A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *The Journal of infection*.
- Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S. & Songer, J. G. (2007).** Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *Journal of clinical microbiology* **45**, 1963-1964.
- Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S. & other authors (2008).** Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of clinical microbiology* **46**, 431-437.
- Kim, H., Riley, T. V., Kim, M., Kim, C. K., Yong, D., Lee, K., Chong, Y. & Park, J. W. (2008).** Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *Journal of clinical microbiology* **46**, 1116-1117.
- Kleinkauf, N., Weiss, B., Jansen, A., Eckmanns, T., Bornhofen, B., Kuehnen, E., Weil, H. P. & Michels, H. (2007).** Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Germany. *Euro Surveill* **12**, E071115 071112  
Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=073307>.
- Kuijper, E. J., de Weerd, J., Kato, H., Kato, N., van Dam, A. P., van der Vorm, E. R., Weel, J., van Rhee, C. & Dankert, J. (2001).** Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**, 528-534.
- Kuijper, E. J., Coignard, B. & Tull, P. (2006a).** Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* **12 Suppl 6**, 2-18.
- Kuijper, E. J., van den Berg, R. J., Debast, S., Visser, C. E., Veenendaal, D., Troelstra, A., van der Kooi, T., van den Hof, S. & Notermans, D. W. (2006b).** *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. *Emerging infectious diseases* **12**, 827-830.
- Kuijper, E. J., Barbut, F., Brazier, J. S. & other authors (2008).** Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* **13**.
- Kuijper, E. J., van den Berg, R. J. & Brazier, J. S. (2009).** Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **551**, 159-171.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. & Salzberg, S. L. (2004).** Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**, R12.
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A. & Kelly, C. P. (2000).** Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *The New England journal of medicine* **342**, 390-397.

- Labbe, A. C., Poirier, L., Maccannell, D., Louie, T., Savoie, M., Beliveau, C., Laverdiere, M. & Pepin, J. (2008).** *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 3180-3187.
- Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P. & Borriello, S. P. (1978).** *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* **1**, 1063-1066.
- Larson, H. E., Barclay, F. E., Honour, P. & Hill, I. D. (1982).** Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants. *J Infect Dis* **146**, 727-733.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J. F. & Pons, J. L. (2004).** Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *Journal of clinical microbiology* **42**, 2609-2617.
- Lemee, L., Bourgeois, I., Ruffin, E., Collignon, A., Lemeland, J. F. & Pons, J. L. (2005).** Multilocus sequence analysis and comparative evolution of virulence-associated genes and housekeeping genes of *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, England)* **151**, 3171-3180.
- Levinson, G. & Gutman, G. A. (1987).** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution* **4**, 203-221.
- Loo, V. G., Poirier, L., Miller, M. A. & other authors (2005).** A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *The New England journal of medicine* **353**, 2442-2449.
- Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M. & other authors (2009).** Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* **458**, 1176-1179.
- Maiden, M. C. (2006).** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**, 561-588.
- Maiden, M. C. (2008).** Population genomics: diversity and virulence in the Neisseria. *Curr Opin Microbiol* **11**, 467-471.
- Marsh, J. W., O'Leary, M. M., Shutt, K. A., Pasculle, A. W., Johnson, S., Gerding, D. N., Muto, C. A. & Harrison, L. H. (2006).** Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. *Journal of clinical microbiology* **44**, 2558-2566.
- McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Owens, R. C., Jr., Kazakova, S. V., Sambol, S. P., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2005).** An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine* **353**, 2433-2441.
- McDonald, L. C., Owings, M. & Jernigan, D. B. (2006).** *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerging infectious diseases* **12**, 409-415.

- Merrigan, M., Sambol, S., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2003).** Susceptibility of hamsters to human pathogenic *Clostridium difficile* strain B1 following clindamycin, ampicillin or ceftriaxone administration. *Anaerobe* **9**, 91-95.
- Monaghan, T., Boswell, T. & Mahida, Y. R. (2008).** Recent advances in *Clostridium difficile*-associated disease. *Gut*.
- Morgan, O. W., Rodrigues, B., Elston, T., Verlander, N. Q., Brown, D. F., Brazier, J. & Reacher, M. (2008).** Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: a case-case study. *PLoS ONE* **3**, e1812.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Muto, C. A., Pokrywka, M., Shutt, K. & other authors (2005).** A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**, 273-280.
- Mylonakis, E., Ryan, E. T. & Calderwood, S. B. (2001).** *Clostridium difficile*--Associated diarrhea: A review. *Arch Intern Med* **161**, 525-533.
- Nei, M. & Gojobori, T. (1986).** Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution* **3**, 418-426.
- Nübel, U., Roumagnac, P., Feldkamp, M. & al., e. (2008).** Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Nat Acad Sciences, USA In press*.
- Nübel, U., Dordel, J., Kurt, K. & other authors (2010).** A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **6**, e1000855.
- O'Connor, J. R., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2009).** *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology* **136**, 1913-1924.
- Oefner, P. J. & Underhill, P. A. (1995).** Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) *Am J Hum Genet* **57**, 266.
- Parkhill, J. (2008).** Time to remove the model organism blinkers. *Trends Microbiol* **16**, 510-511.
- Pear, S. M., Williamson, T. H., Bettin, K. M., Gerding, D. N. & Galgiani, J. N. (1994).** Decrease in nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea by restricting clindamycin use. *Ann Intern Med* **120**, 272-277.
- Pearson, T., Busch, J. D., Ravel, J. & other authors (2004).** Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13536-13541.

- Pepin, J., Saheb, N., Coulombe, M. A. & other authors (2005).** Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* **41**, 1254-1260.
- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F. & Baquero, F. (1987).** Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **20**, 631-638.
- Pituch, H., van den Braak, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Martirosian, G., Obuch-Woszczatynski, P., Luczak, M. & Meisel-Mikolajczyk, F. (2001).** Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. *Clin Microbiol Infect* **7**, 442-446.
- Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M. & Boquet, P. (1988).** Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* **56**, 2299-2306.
- Posada, D. & Crandall, K. A. (1998).** MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Rocha, E. P., Smith, J. M., Hurst, L. D., Holden, M. T., Cooper, J. E., Smith, N. H. & Feil, E. J. (2006).** Comparisons of dN/dS are time dependent for closely related bacterial genomes. *J Theor Biol* **239**, 226-235.
- Rodriguez-Martinez, J. M., Velasco, C., Briales, A., Garcia, I., Conejo, M. C. & Pascual, A. (2008).** Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **61**, 1240-1243.
- Roumagnac, P., Weill, F. X., Dolecek, C. & other authors (2006).** Evolutionary history of *Salmonella typhi*. *Science* **314**, 1301-1304.
- Rozas, J. & Rozas, R. (1999).** DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**, 174-175.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000).** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **132**, 365-386.
- Rupnik, M., Braun, V., Soehn, F., Janc, M., Hofstetter, M., Laufenberg-Feldmann, R. & von Eichel-Streiber, C. (1997).** Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS microbiology letters* **148**, 197-202.
- Rupnik, M. (2007).** Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clin Microbiol Infect* **13**, 457-459.
- Rupnik, M., Widmer, A., Zimmermann, O., Eckert, C. & Barbut, F. (2008).** *Clostridium difficile* toxinotype V, ribotype 078, in animals and humans. *Journal of clinical microbiology* **46**, 2146.
- Rupnik, M., Wilcox, M. H. & Gerding, D. N. (2009).** *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**, 526-536.



- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. (2000).** Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**, 944-945.
- Sambrook, S., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sato, H., Kato, H., Koiwai, K. & Sakai, C. (2004).** [A nosocomial outbreak of diarrhea caused by toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a cancer center hospital]. *Kansenshogaku Zasshi* **78**, 312-319.
- Saxton, K., Baines, S. D., Freeman, J., O'Connor, R. & Wilcox, M. H. (2009).** Effects of exposure of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 to fluoroquinolones in a human gut model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**, 412-420.
- Schlotterer, C. (2000).** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-371.
- Sebaihia, M., Wren, B. W., Mullany, P. & other authors (2006).** The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature genetics* **38**, 779-786.
- Silva, J., Jr. (1994).** *Clostridium difficile* nosocomial infections--still lethal and persistent. *Infect Control Hosp Epidemiol* **15**, 368-370.
- Smith, A. (2005).** Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill* **10**, E050630 050632.
- Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., McDonald, L. C. & Limbago, B. M. (2009).** *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerging infectious diseases* **15**, 819-821.
- Spigaglia, P. & Mastrantonio, P. (2002).** Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* **40**, 3470-3475.
- Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P., Brazier, J. S., Barbut, F., Delmee, M., Kuijper, E. & Poxton, I. R. (2008).** Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe. *Journal of medical microbiology* **57**, 784-789.
- Stabler, R. A., He, M., Dawson, L. & other authors (2009).** Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol* **10**, R102.
- Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B. & Popoff, M. (2000).** Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS microbiology letters* **186**, 307-312.

- Stubbs, S. L., Brazier, J. S., O'Neill, G. L. & Duerden, B. I. (1999).** PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *Journal of clinical microbiology* **37**, 461-463.
- Taylor, N. S., Thorne, G. M. & Bartlett, J. G. (1981).** Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infect Immun* **34**, 1036-1043.
- Thomas, C., Stevenson, M. & Riley, T. V. (2003).** Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **51**, 1339-1350.
- Turner, K. M. & Feil, E. J. (2007).** The secret life of the multilocus sequence type. *International journal of antimicrobial agents* **29**, 129-135.
- Valiquette, L., Cossette, B., Garant, M. P., Diab, H. & Pepin, J. (2007).** Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain. *Clin Infect Dis* **45 Suppl 2**, S112-121.
- van den Berg, R. J., Schaap, I., Templeton, K. E., Klaassen, C. H. & Kuijper, E. J. (2007).** Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of clinical microbiology* **45**, 1024-1028.
- Vonberg, R. P., Schwab, F. & Gastmeier, P. (2007).** *Clostridium difficile* in discharged inpatients, Germany. *Emerging infectious diseases* **13**, 179-180.
- Vonberg, R. P. & Gastmeier, P. (2008).** *Clostridium-difficile*-assoziierte Diarrhö: Zunehmende Inzidenz in Deutschland. *Epid Bull* **15**, 119.
- Vonberg, R. P., Kuijper, E. J., Wilcox, M. H. & other authors (2008).** Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 5**, 2-20.
- Voth, D. E. & Ballard, J. D. (2005).** *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical microbiology reviews* **18**, 247-263.
- Walkty, A., Boyd, D. A., Gravel, D. & other authors (2010).** Molecular characterization of moxifloxacin resistance from Canadian *Clostridium difficile* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **66**, 419-424.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E. & McDonald, L. C. (2005).** Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* **366**, 1079-1084.
- Wilson, D. J., Falush, D. & McVean, G. (2005).** Germs, genomes and genealogies. *Trends Ecol Evol* **20**, 39-45.
- Wilson, V., Cheek, L., Satta, G., Walker-Bone, K., Cubbon, M., Citron, D., Gerding, D. N. & Llewelyn, M. J. (2010).** Predictors of death after *Clostridium difficile* infection: a report

on 128 strain-typed cases from a teaching hospital in the United Kingdom. *Clin Infect Dis* **50**, e77-81.

**Xiao, W., Stern, D., Jain, M., Huber, C. G. & Oefner, P. J. (2001).** Multiplex capillary denaturing high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Biotechniques* **30**, 1332-1338.

**Zaiß, N. H., Weile, J., Ackermann, G., Kuijper, E., Witte, W. & Nübel, U. (2007).** A case of *Clostridium difficile*-associated disease due to the highly virulent clone of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, March 2007 in Germany. *Euro Surveill* **12**, E071115 071111 Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=073306>.

**Zaiß, N. H., Rupnik, M., Kuijper, E. J., Harmanus, C., Michielsen, D., Janssens, K. & Nübel, U. (2009).** Typing *Clostridium difficile* strains based on tandem repeat sequences. *BMC microbiology* **9**, 6.

**Zaiß, N. H., Witte, W. & Nübel, U. (2010).** Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerging infectious diseases* **16**, 675-677.

**Zilberberg, M. D., Shorr, A. F. & Kollef, M. H. (2008).** Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005. *Emerging infectious diseases* **14**, 929-931.

## Anhang

**Tab. A1: Diversität von *C. difficile* aus schweren Infektionsverläufen in Deutschland, 2008**

PCR-Ribotyp	Anzahl der Isolate (n = 670)	Anzahl der Krankenhäuser (n = 84)
001	312	59
078	53	19
027	53	16
014	27	13
046	15	8
012	15	7
157	12	7
053	11	5
015	10	7
072	10	6
002	9	8
010	9	4
039	9	4
042	8	6
017	7	5
117	7	5
043	6	3
081	5	4
029	5	4
045	4	2
094	4	2
RK17	4	2
016	3	2
049	3	2
070	3	2
083	3	2
087	3	2
023	3	2
RK11	3	2
035	2	1
005	2	1
011	2	1
031	2	1
045	2	1
090	2	1
156	2	1
159	2	1
149	2	1
064	2	1
RK110	2	1
RK12	2	1
RK120	2	1
RK13	2	1
RK14	2	1
RK19	2	1
RK127	2	1
RK128	2	1
RK117	2	1
RK131	2	1
RK132	2	1
RK129	2	1
RK130	2	1
RK133	2	1
RK134	2	1
RK136	2	1
RK137	1	1
RK138	1	1

**Tab. A2:** Wiederholungssequenzen im Genom des *C. difficile* Stammes 630

ID	Position im Genom ( <i>C. difficile</i> 630)	Länge der Wiederholungseinheit (bp)	Kopiezahl	Sequenzübereinstimmung der Wiederholungseinheiten (%)	Gesamtlänge (bp)
TR1	400494 : 400721	18	12.7	69	230
TR2	400961 : 401279	27	11.8	68	320
TR3	636078 : 636348	20	13.7	64	270
TR4	677132 : 677386	17	15.0	97	255
TR5	682554 : 682828	17	16.2	67	270
TR6	725321 : 725600	21	13.3	71	270
TR7	739035 : 739215	18	10.3	66	185
TR8	771205 : 771356	11	14.8	71	160
TR9	3700701 : 3700992	19	15.4	72	290
TR10	3753166 : 3753574	23	18.2	71	400
TR11	3665310 : 3665645	30	11.2	89	335
TR12	400554 : 400702	27	5.5	67	150
TR13	401151 : 401324	27	6.4	64	170
TR14	670339 : 670417	17	4.7	74	80
TR15	670568 : 670686	16	7.3	66	115
TR16	679680 : 679864	34	5.5	68	190
TR17	679714 : 679881	33	5.0	66	165
TR18	689278 : 689386	14	7.8	66	110
TR19	701408 : 701883	43	11.0	82	470
TR20	733661 : 733770	15	7.6	68	110
TR21	734804 : 735008	25	8.2	69	205
TR22	738531 : 738884	35	10.2	63	360
TR23	743503 : 744009	42	12.1	94	510
TR24	764343 : 764835	43	11.4	84	490
TR25	764631 : 764777	20	6.7	70	130
TR26	770033 : 770368	40	8.4	88	330
TR27	781822 : 782050	38	6.0	76	230
TR28	806314 : 806583	39	6.8	79	365
TR29	814274 : 814723	36	13.2	63	475
TR30	816948 : 817247	36	8.4	72	300
TR31	828221 : 828387	19	8.8	90	170
TR32	854835 : 855178	39	8.8	73	340
TR33	1241643 : 1241870	41	5.6	85	230
TR34	1669812 : 1669894	15	5.6	70	85
TR35	2981814 : 2982021	36	5.8	86	210
TR36	3035903 : 3035974	15	4.8	77	70
TR37	3668533 : 3668635	21	4.8	73	100
TR38	3700701 : 3700997	38	7.8	89	300
TR39	3724942 : 3725164	34	6.5	79	220
TR40	3724944 : 3725071	17	7.6	81	130
TR41	3725013 : 3725106	16	5.6	72	90
TR42	3725061 : 3725143	17	4.7	71	80
TR43	3725092 : 3725197	17	5.8	71	100
TR44	3777394 : 3777620	32	7.0	73	220
TR45	3781156 : 3781395	27	8.9	70	240
TR46	3798443 : 3798644	36	5.6	85	200
TR47	3800008 : 3800345	33	10.2	89	340
TR48	3800105 : 3800229	18	7.4	68	130
TR49	3800091 : 3800211	15	7.5	67	110

**Tab. A3: Identifizierte TRST-Sequenztypen mit jeweiliger Abfolge der Wiederholungsmotive der Regionen TR6 und TR10 – Teil I**

TRST-Typ	Abfolge der TR6 Wiederholungsmotive	Abfolge der TR10 Wiederholungsmotive
tr-001	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N006-N004-N007-N004-N008-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-002	R044-R011-R051-R007-R020-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-003	R044-R011-R051-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-004	R007-R003-R019-R018-R019-R018-R019-R018-R019-R018-R077-R018-R019-R018-R008-R028-R078-R028-R038-R079-R022-R080	N016-N017-N018-N035-N004-N005-N004-N005-N004-N002-N004-N002-N004-N005-N029-N038-N037-N018-N011
tr-005	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N004-N008-N004-N008-N004-N006-N004-N005-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-006	R044-R011-R051-R007-R047-R024-R015-R053-R018-R019-R007-R019-R048-R019-R018-R032-R049-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N008-N004-N007-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-007	R007-R012-R019-R018-R019-R018-R019-R018-R019-R007-R031-R007-R008-R028-R026-R028-R037-R028-R037-R036-R038-R071-R022-R035	N016-N017-N018-N042-N033-N004-N005-N004-N036-N004-N038-N037-N043-N011
tr-008	R043-R014-R013-R054-R010-R013-R054-R029-R039-R025-R054-R007-R025-R054-R010-R013-R054-R027-R013-R054-R042	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011
tr-009	R044-R011-R051-R007-R016-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N005-N012-N006-N009-N033-N009-N005-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-010	R044-R011-R055-R007-R023-R056-R015-R053-R011-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N005-N012-N006-N009-N014-N015-N011
tr-011	R044-R011-R051-R007-R015-R019-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-012	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-013	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-014	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-015	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N008-N004-N008-N009-N010-N004-N014-N015-N011
tr-016	R044-R007-R051-R021-R063-R004-R050-R007-R063-R004-R050-R033-R003-R019-R033-R003-R064-R033-R003-R064-R033-R003-R064-R007-R019-R065-R006-R033-R003-R066-R001-R032-R067-R068-R069-R034-R035	N003-N008-N004-N020-N021-N011-N011
tr-017	R007-R003-R019-R018-R070-R018-R019-R018-R008-R028-R026-R028-R026-R028-R038-R071-R022-R035	N016-N017-N018-N011
tr-018	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N005-N004-N008-N009-N005-N004-N023-N041-N011
tr-019	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R028-R028-R038-R072-R062-R022-R035	N003-N005-N004-N006-N004-N026-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-020	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N005-N004-N006-N004-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-021	R044-R011-R051-R007-R015-R019-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N004-N008-N004-N008-N004-N006-N004-N005-N009-N005-N004-N014-N015-N011

**Tab. A3: Identifizierte TRST-Sequenztypen mit jeweiliger Abfolge der Wiederholungsmotive der Regionen TR6 und TR10 – Teil II**

TRST-Typ	Abfolge der TR6 Wiederholungsmotive	Abfolge der TR10 Wiederholungsmotive
tr-022	R044-R011-R055-R007-R023-R056-R015-R053-R011-R019-R058-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N048-N049-N009-N005-N009-N005-N009-N010-N004-N008-N004-N011
tr-023	R044-R007-R051-R021-R063-R004-R050-R007-R063-R004-R050-R033-R003-R019-R033-R003-R064-R033-R003-R064-R033-R003-R064-R007-R019-R065-R006-R033-R003-R066-R001-R032-R067-R068-R069-R034-R035	N003-N008-N004-N020-N021-N011
tr-024	R044-R011-R051-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N004-N008-N004-N008-N004-N006-N004-N005-N009-N032-N004-N005-N004-N011
tr-025	R044-R011-R051-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N004-N006-N004-N005-N009-N032-N004-N005-N004-N011
tr-026	R044-R011-R051-R007-R016-R011-R073-R024-R015-R053-R011-R051-R004-R019-R074-R019-R048-R019-R018-R032-R049-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N005-N012-N006-N009-N033-N009-N039-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-027	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R028-R028-R038-R072-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N009-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-028	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R019-R048-R019-R018-R075-R049-R038-R062-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N005-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-029	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N005-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-030	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R076-R028-R038-R062-R022-R035	N003-N008-N004-N006-N004-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-031	R044-R011-R051-R007-R016-R011-R055-R007-R016-R011-R051-R007-R045-R011-R055-R007-R023-R007-R015-R053-R051-R004-R019-R018-R019-R060-R019-R018-R032-R061-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N014-N015-N011
tr-032	R044-R011-R051-R059-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N046-N004-N014-N045-N011
tr-033	R043-R014-R013-R054-R010-R013-R054-R029-R039-R025-R035	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011
tr-034	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R028-R028-R038-R072-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N006-N004-N006-N004-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-(N004)-N011
tr-035	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R007-R032-R028-R038-R072-R062-R022-R035	N025-N002-N004-N005-N004-N006-N009-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-036	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R028-R028-R028-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N022-N008-N009-N026-N023-N004-N023-N024-N011
tr-037	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R007-R032-R028-R028-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N044-N004-N006-N022-N005-N004-N023-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-038	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R007-R032-R028-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N044-N004-N006-N022-N005-N004-N023-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-039	R044-R011-R055-R007-R023-R056-R015-R053-R011-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N013-N013-N006-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N004-N008-N004-N006-N004-N005-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-040	R044-R011-R051-R002-R040-R018-R032-R007-R032-R028-R005-R028-R036-R038-R062-R022-R035	N003-N005-N004-N006-N004-N005-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-041	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R028-R038-R072-R062-R022-R035	N003-N005-N004-N006-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011
tr-042	R044-R007-R020-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011

**Tab. A3: Identifizierte TRST-Sequenztypen mit jeweiliger Abfolge der Wiederholungsmotive der Regionen TR6 und TR10 – Teil III**

TRST-Typ	Abfolge der TR6 Wiederholungsmotive	Abfolge der TR10 Wiederholungsmotive
tr-043	R044-R011-R051-R007-R015-R019-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N008-N009-N005-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-044	R044-R011-R051-R007-R023-R021-R030-R017-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N011
tr-045	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N006-N004-N007-N004-N008-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-046	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N008-N009-N005-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-047	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R015-R053-R004-R019-R018-R019-R048-R019-R018-R032-R049-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N005-N012-N006-N009-N005-N009-N005-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-048	R044-R011-R051-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N005-N012-N006-N009-N033-N009-N005-N009-N010-N034-N014-N024-N011
tr-049	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N050-N002-N004-N008-N004-N051-N009-N051-N004-N006-N004-N008-N004-N046-N034-N014-N024-N011
tr-050	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N040-N004-N005-N004-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N005-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-051	R044-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N006-N009-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-052	R044-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N005-N004-N006-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-053	R044-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N008-N009-N005-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-054	R044-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N007-N004-N008-N009-N010-N004-N014-N004-N011
tr-055	R044-R007-R020-R007-R020-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N003-N008-N009-N005-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-056	R044-R011-R051-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N004-N006-N004-N008-N004-N008-N009-N006-N004-N006-N004-N008-N004-N011
tr-057	R044-R007-R020-R007-R020-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N002-N004-N008-N009-N005-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-058	R044-R011-R051-R007-R015-R019-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N008-N004-N006-N004-N006-N004-N007-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-059	R044-R011-R051-R007-R015-R019-R046-R022-R035	N003-N002-N004-N008-N004-N006-N004-N006-N004-N007-N004-N008-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-060	R007-R003-R008-R028-R026-R028-R008-R007-R008-R028-R026-R028-R026-R028-R038-R071-R022-R035	N016-N017-N018-N035-N004-N005-N004-N005-N004-N036-N004-(N002)-N038-N037-N018-N011
tr-061	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N014-N045-N011
tr-062	R057-R011-R051-R007-R023-R024-R015-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-063	R043-R014-R013-R054-R010-R013-R054-R042-R029-R039-R025-R054-R010-R013-R054-R042-R029-R039-R025-R035	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011



**Tab. A3: Identifizierte TRST-Sequenztypen mit jeweiliger Abfolge der Wiederholungsmotive der Regionen TR6 und TR10 – Teil IV**

TRST-Typ	Abfolge der TR6 Wiederholungsmotive	Abfolge der TR10 Wiederholungsmotive
tr-064	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N047-N017-N018-N011
tr-065	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N008-N009-N005-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-066	R043-R014-R013-R054-R010-R013-R054-R042-R039-R025-R054-R042-R010-R013-R054-R042-R039-R025-R035	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011
tr-067	R043-R014-R013-R054-R042-R029-R039-R025-R054-R027-R013-R054-R042-R010-R013-R054-R027-R013-R035	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011
tr-068	R044-R011-R055-R007-R023-R056-R015-R053-R011-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N008-N009-N005-N009-N005-N004-N008-N004-N008-N009-N006-N009-N005-N004-N014-N015-N011
tr-069	R044-R007-R051-R021-R063-R004-R050-R007-R063-R004-R050-R033-R003-R019-R033-R003-R064-R007-R003-R064-R033-R003-R064-R007-R019-R065-R006-R033-R003-R066-R001-R032-R067-R068-R069-R034-R035	N003-N008-N004-N020-N021-N011-N011
tr-070	R043-R014-R013-R054-R010-R013-R054-R042-R029-R039-R025-R054-R007-R025-R054-R042-R010-R013-R054-R027-R013-R035	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011
tr-071	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N012-N006-N019-N008-N004-N014-N015-N011
tr-072	R044-R011-R051-R007-R023-R024-R052-R053-R004-R019-R018-R019-R018-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N004-N007-N004-N008-N009-N010-N004-N005-N004-N011
tr-073*	R043-R014-R013-R054-R042-R029-R039-R025-R054-R007-R025-R054-R042-R010-R013-R054-R027-R013-R035	N027-N017-N004-N028-N029-N002-N030-N031-N011
tr-074*	R044-R011-R051-R007-R016-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N008-N004-N006-N004-N052-N009-N033-N004-N006-N004-N005-N004-N005-N004-N011
tr-075*	R044-R007-R020-R007-R020-R021-R030-R007-R015-R008-R009-R022-R035	N003-N011
tr-076*	R044-R011-R051-R028-R040-R018-R032-R007-R032-R028-R028-R038-R062-R022-R035	N003-N002-N004-N005-N004-N006-N009-N026-N008-N022-N008-N009-N005-N004-N023-N004-N023-N024-N011

\* Nach 2009 identifizierte TRST-Sequenztypen (Zaiß *et al.*, 2009)

**Tab. A4: DNA-Sequenzen identifizierter Wiederholungsmotive der TRST-Region TR6**

Wiederholungsmotive der Region TR6 identifiziert in 154 <i>C. difficile</i> Isolaten				
>R001 CTTGCATACCACTAATAGTGC	>R017 CTTGCATATCGCTAATAGTGA	>R033 CTTGCATATCGCTAATATTGC	>R049 CTTGCATATTGCTAATAGTAC	>R065 TTTGTATATCGCTAATAGTGC
>R002 CTTGCATATCACTAATAGTAC	>R018 TTTGCATATCGCTAATAGTGC	>R034 CTTCAATACCACTGATACTAC	>R050 CATCCATACCACTGATATTGC	>R066 TTTCAATACCATTGATATTGC
>R003 CTTGCATGCCACTAATAGTGC	>R019 CTTCGATACCATTGATATTGC	>R035 CTTGCATATTACTAATATTAC	>R051 CATCCATACTACTGATACTGC	>R067 CTTGCATATCGCTAATATTAC
>R004 CTTGCATACTACTAATAGTGC	>R020 CATTCACTACTGATACTGC	>R036 CTTGCATATCGCCAATAGTAC	>R052 CTTGCATACCACTAATAGTGT	>R068 CTTGCATATCGTTAATATTAC
>R005 CCTGCATATCGCTAATAGTAC	>R021 CTTGCATATCGCTAATAGTGT	>R037 CTTCAATGCCATTGATACTGC	>R053 TTTCGATACCATTGATATTGC	>R069 CCTGCATGCCATTAACAGTGC
>R006 CTTCAATACCACTGATGCTGC	>R022 CTTCGATACCCTGATACTAC	>R038 CTTGCATATAGTTAATATTAC	>R054 CTTGCATATCGCCAATATTAC	>R070 TTTCGATACCATTGATATTAC
>R007 CTTGCATATCGCTAATAGTGC	>R023 CATTCACTACCCTGATACTAC	>R039 CTTGCACGCTGCTAATAGTGC	>R055 CATCCATACTACTGATACTTC	>R071 CCTGCATGCCGTTAACAGTGC
>R008 CTTCGATACCATTAATATTGC	>R024 CTTGCATATCGCCAATAGTGC	>R040 CTTCGATATCATTGATATTGC	>R056 CTTGCATATCTCCAATAGTGC	>R072 CCTGCATATAGTTAATATTAC
>R009 TTTGCATATCACTAATAGTGC	>R025 CCTCTATACCACTGATACTGC	>R041 TTTGCATATCGCCAATAGTGC	>R057 CTTGCATATCAGTAATACTGC	>R073 CATCCATACTACTGATACTAC
>R010 CTTGCATGCCGCTAATAGTGC	>R026 CTTCAATACCATTGATACTGC	>R042 CTTGCATATCGCTGATAGTAC	>R058 TTTGAATATCGCTAATAGTGC	>R074 TTTGCATACTACTAATAGTGC
>R011 CTTGCATACTATTAATAGTGC	>R027 CTTGCATATCGCTGATAGTGC	>R043 CTTGCATATCACCAATATTAC	>R059 CTTGAATATCGCTAATAGTGC	>R075 CTTCGATACCATTGATACTAC
>R012 CTTGCATGCCACTAATATTGC	>R028 CTTGCATATCGCTAATAGTAC	>R044 CTTGCATATCAGTAATACTGT	>R060 TTTGCATATCGCTAATAGTGT	>R076 CTTCGATACCATTTATACTGC
>R013 CTTCTATACCACTGATACTGC	>R029 CTTGCATATCGATGATAGTAC	>R045 CATCCATACCACTGATACTGC	>R061 CTTGCATATTGCTAATATTAC	>R077 CTTCGATACCATTGATATTAC
>R014 CTTGCATGCCACTAATAGTGA	>R030 CATCTATACCACTGATACTGC	>R046 TTTGCATATTACTAATAGTGC	>R062 CCTGCATGCCATTAACAGTAC	>R078 CTTCAATAACATTGATACTGC
>R015 CTTGCATGCCACTAATAGTGT	>R031 TTTCGATACCATTAATATTGC	>R047 CATCTATACCACTGATACTAC	>R063 CATCCATGCCACTGATACTGC	>R079 CCTGAATGCCATTAACAGTGC
>R016 CATTCACTACCCTGATACTGC	>R032 CTTCGATACCATTGATACTGC	>R048 TTTGCATATCGCTAATAGTGT	>R064 CTTCGATACCCTGATACTGC	>R080 CTTGCATATTACTAATGTTAC

**Tab. A5: DNA-Sequenzen identifizierter Wiederholungsmotive der TRST-Region TR10**

Wiederholungsmotive der Region TR10 identifiziert in 154 <i>C. difficile</i> Isolaten			
>N001 AAATTAATTATTATATTTCTTT	>N017 AAATTAATTTTCTATGTTTCTT	>N033 AGATTAGTTTCTATACTTCCT	>N049 AAATTAATTTTCTATCCTTCCT
>N002 AAATTAATTTTCTATATTTCTT	>N018 AAATTAGCTTATTATACTTTTT	>N034 AAATTAGTTTATTATGCTTCTTT	>N050 AAATTAATGTATTGTGTTTCTTT
>N003 AAATTAATGTATTGTATTTCTTT	>N019 GAATTAGTTTATTATACTTCTTT	>N035 AAATTAATTTTATACTTCCT	>N051 AGATTAATTCCTATACTTCCT
>N004 AAATTAGTTTATTATACTTCTTT	>N020 AGATTAATTTTCTATATTTCTT	>N036 AGATTAATTTCCATACTTCCT	
>N005 AGATTAATTTTCTATACTTCCT	>N021 AAATTAGTTTATTATACTTCCT	>N037 AAATTAGCTCATTATACTTCTTT	
>N006 AGATTAGCTTTCTATACTTCCT	>N022 AAATTAGTTCATTATACTTCTTT	>N038 AAATTAATTTCCATATTCTT	
>N007 AGATTAGCTTTCTATATTTCTT	>N023 AAATTAATTTTCTACACTTCCT	>N039 AGATTAATTTTCTATCCTTCCT	
>N008 AAATTAATTTTCTATACTTCCT	>N024 AAATTAGTTTATTATATTTCTT	>N040 AAACTAATTTTCTATACTTCCT	
>N009 AAATTAGTTTATTACACTTCTTT	>N025 AAATTAATATATTGTATTTCTTT	>N041 AAATTAGTTTATTATACTTTTT	
>N010 AGATTAATTTTCTATACTTCTT	>N026 AGATTAATTTTCTATACTTCTTT	>N042 AAATTAATTTTATACTTCTTT	
>N011 AAATTAATTTTCTATACTTCTT	>N027 AAGTTAATTTATTGTATTTCTTT	>N043 AAATTAGCTTATTATATTCTT	
>N012 AAATTAGTTTACTATACTTCTTT	>N028 AGATTAATTTTCTATATTCCT	>N044 AGATTAGCTTCTATACTTTCT	
>N013 AGATTAGCTTTCTATACTTCTTT	>N029 AAATTAATTTATTATATTTCTTT	>N045 AAATTAGTTTATTATACTTATTT	
>N014 AGATTAATTTTCTACACTTCCT	>N030 AAGTTAGCTCATTATACTTCTTT	>N046 AAATTAATTTTCTATACTTTCT	
>N015 AAATTAATTTATTATATTTTTT	>N031 AAATTAGCTTATTATACTTCTT	>N047 AAATTAATTATTGTGTTTCTTT	
>N016 AAATTAATTTATTGTATTTCTTT	>N032 AGATTAACCTTCTATACTTTCT	>N048 GAATTAGTTTATTATACTCCTTT	

**Tab. A6:** *C. difficile* Stammsammlung zur Evaluierung der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung–Teil I

Isolat (RKI-ID)	synonyme Bezeichnung	Quelle	Herkunftsland (Stadt)	PCR- Ribotyp	TRST- Typ	MLST- Typ
07-00001	NCTC13366	NCTC	United Kingdom (Stoke Mandeville)	027	tr-027	ST-44
07-00002	NCTC13404	NCTC	United Kingdom	106	tr-062	
07-00003	NCTC11204	NCTC	United Kingdom (Sheffield)	001	tr-001	ST-3
07-00004	NCTC11205	NCTC	United Kingdom (Sheffield )	001	tr-001	ST-3
07-00005	NCTC11207	NCTC	United Kingdom (Sheffield)	001	tr-001	ST-3
07-00006	NCTC11223	NCTC	United Kingdom (Birmingham)	012	tr-012	ST-5
07-00007	NCTC12726	NCTC	United Kingdom (London)	039	tr-039	
07-00008	NCTC13287	NCTC	United Kingdom (Carlisle)	017	tr-017	
07-00009	NCTC13307 (630)	NCTC	Switzerland (Zürich)	012	tr-012	
07-00010	SMI002	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	012	tr-012	
07-00011	SMI003	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	002	tr-002	ST-9
07-00012	SMI007	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	014	tr-065	ST-36
07-00013	SMI011	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	117	tr-052	
07-00014	SMI012	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	010	tr-010	
07-00015	SMI014	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	001	tr-001	
07-00017	SMI025	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	003	tr-003	ST-37
07-00018	SMI035	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	014	tr-014	
07-00019	SMI037	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	011	tr-021	ST-39
07-00020	SMI044	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	015	tr-015	
07-00021	SMI046	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	016	tr-016	
07-00022	SMI047	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	029	tr-029	
07-00023	SMI055	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	066	tr-067	ST-41
07-00024	SMI073	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden	081	tr-028	
07-00025	T-378	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden (Huddinge)	027	tr-027	
07-00026	Ö99-1670	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden (Örebro)	027	tr-027	
07-00027	A177:1	T. Akerlund, Solna, Sweden	Sweden (Malmö)	027	tr-027	ST-44
07-00028	TY4017	N. Nischik, Düsseldorf, Germany	Germany (Düsseldorf)	001	tr-001	
07-00031	TY4366	N. Nischik, Düsseldorf, Germany	Germany (Düsseldorf)	053	tr-012	ST-6
07-00033	TY4560	N. Nischik, Düsseldorf, Germany	Germany (Düsseldorf)	053	tr-012	
07-00034	TY4844	N. Nischik, Düsseldorf, Germany	Germany (Düsseldorf)	001	tr-001	
07-00037	TY4406	N. Nischik, Düsseldorf, Germany	Germany (Düsseldorf)	001	tr-001	
07-00038	SE844 (IIIa)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Brüssel Belgium	080	tr-041	
07-00039	R10278 (IIIb)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	United Kingdom	027	tr-027	
07-00040	CH6230 (IIIc)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	United States (Chicago)	111	tr-035	ST-46
07-00041	SE881 (V)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Belgium (Brüssel)	066	tr-066	ST-41
07-00042	51377 (VI)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Belgium (Brüssel)	066	tr-067	
07-00043	57267 (VII)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Belgium (Brüssel)	063	tr-063	ST-42
07-00044	1470 (VIII)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Belgium (Brüssel)	017	tr-017	
07-00045	51680 (IX)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Belgium (Brüssel)	019	tr-019	ST-45
07-00046	8864 (X)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Belgium (Brüssel)	036	tr-036	
07-00047	IS58 (XIa)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	United Kingdom	033	tr-033	
07-00048	630 (0)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	Switzerland (Zürich)	012	tr-012	
07-00050	AB403	A. Becker, Karlsruhe, Germany	Germany (Karlsruhe)	001	tr-001	ST-3
07-00051	AB424	A. Becker, Karlsruhe, Germany	Germany (Karlsruhe)	001	tr-001	ST-3
07-00052	AB429	A. Becker, Karlsruhe, Germany	Germany (Karlsruhe)	117	tr-052	
07-00054	AB451	A. Becker, Karlsruhe, Germany	Germany (Karlsruhe)	002	tr-002	
07-00055	AB453	A. Becker, Karlsruhe, Germany	Germany (Karlsruhe)	001	tr-001	ST-3
07-00056	AB454	A. Becker, Karlsruhe, Germany	Germany (Karlsruhe)	015	tr-045	ST-4
07-00057	R5	H. Rüssmann, München, Germany	Germany (München)	015	tr-015	ST-4
07-00058	R37	H. Rüssmann, München, Germany	Germany (München)	126	tr-070	ST-41
07-00059	R79	H. Rüssmann, München, Germany	Germany (München)	016	tr-016	
07-00060	R114	H. Rüssmann, München, Germany	Germany (München)	066	tr-067	ST-41

**Tab. A6:** *C. difficile* Stammsammlung zur Evaluierung der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung - Teil II

Isolat (RKI-ID)	synonyme Bezeichnung	Quelle	Herkunftsland (Stadt)	PCR- Ribotyp	TRST- Typ	MLST- Typ
07-00061	R276	H. Rüssmann, München, Germany	Germany (München)	001	tr-072	ST-3
07-00062	CL1	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	001	tr-001	
07-00063	CL7	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	001	tr-001	
07-00064	CL34	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	002	tr-002	
07-00065	CL36	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	163	tr-025	
07-00066	CL39	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	078	tr-070	ST-41
07-00068	CL42	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	014	tr-014	
07-00069	CL43	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	017	tr-017	ST-2
07-00070	CL45	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	070	tr-048	ST-13
07-00071	CL46	B. Schulte, Tübingen, Germany	Germany (Tübingen)	117	tr-051	ST-9
07-00075	JW609048	J. Weile, Stuttgart, Germany	Stuttgart Germany	014	tr-014	ST-1
07-00076	JW611148	J. Weile, Stuttgart, Germany	Stuttgart Germany	126	tr-070	ST-41
07-00079	JW458241	J. Weile, Stuttgart, Germany	Stuttgart Germany	117	tr-051	
07-00080	JW608204	J. Weile, Stuttgart, Germany	Stuttgart Germany	027	tr-027	
07-00083	ATCC43593	ATCC	Belgium (Brüssel)	060	tr-060	ST-43
07-00084	DSMZ1296	DSMZ	United Kingdom (Sheffield)	001	tr-001	ST-3
07-00085	DSMZ12056	DSMZ	France (Paris)	RKI8	tr-055	ST-1
08-00001	VPI 10463	G. Ackermann, Leipzig, Germany	United States (Blacksburg)	087	tr-058	ST-47
08-00077	P5432	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	027	tr-027	
08-00084	N485	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	042	tr-042	
08-00095	N500	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	017	tr-017	
08-00098	N551	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	011	tr-011	ST-39
08-00104	P5732	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	087	tr-059	ST-47
08-00106	P5735	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	001	tr-001	
08-00120	N711	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	003	tr-003	
08-00124	P6084	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	081	tr-028	
08-00136	P6599	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	126	tr-070	
08-00140	P7034	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	078	tr-070	
08-00148	P7165	B. Bornhofen, Trier, Germany	Germany (Trier)	027	tr-027	
08-00155		MVZ Leverkusen, Germany	Germany (Mechernich)	027	tr-027	
08-00164		T. Rieger, Essen, Germany	Germany (Essen)	046	tr-046	
08-00201		T. Mertes, Koblenz, Germany	Germany (Saarlouis)	027	tr-027	
08-00211		J. Heesemann, München, Germany	Germany (München)	001	tr-001	
08-00233		M. Herrmann, Homburg/Saar, Germany	Germany (Homburg/Saar)	027	tr-027	
08-00240		R. Schwarz, Köln, Germany	Germany (Köln)	001	tr-001	
08-00245		S. Swidsinski, Berlin, Germany	Germany (Berlin)	046	tr-046	
08-00246		S. Swidsinski, Berlin, Germany	Germany (Berlin)	046	tr-046	
08-00267		G. Enders, Stuttgart, Germany	Germany (Stuttgart)	027	tr-027	
DNA-1	597B (XXIV)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI14	tr-026	
DNA-2	8785 (XXII)I	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI22	tr-020	
DNA-3	CH6223 (XXI)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI15	tr-007	
DNA-4	J9965 (XVII)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI23	tr-038	
DNA-5	K095 (XVIII)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	014	tr-014	
DNA-6	TR13 (XIX)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	005	tr-005	
DNA-7	TR14 (XX)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	163	tr-024	
DNA-8	55767 (IV)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	016	tr-016	
DNA-9	7325 (XXV)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	027	tr-027	
DNA-10	7459 (XXVI)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	050	tr-050	
DNA-11	A15	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	066	tr-066	
DNA-12	AC008 (II)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	103	tr-022	
DNA-13	EX623 (I)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI24	tr-053	
DNA-14	IS25 (XII)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	056	tr-056	
DNA-15	KK2443/2006 (XXVII)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI17	tr-057	
DNA-16	R10870 (XIV)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RKI25	tr-018	

**Tab. A6: *C. difficile* Stammsammlung zur Evaluierung der Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung - Teil III**

Isolat (RKI-ID)	synonyme Bezeichnung	Quelle	Herkunftsland (Stadt)	PCR- Ribotyp	TRST- Typ	MLST- Typ
DNA-17	R11402 (XIb)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	033	tr-033	
DNA-18	R9385 (XV)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	United Kingdom	RK126	tr-030	
DNA-19	SUC36 (XVI)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	unknown	RK116	tr-008	
DNA-20	VPI10463 (0)	M. Rupnik, Maribor, Slovenia	United States (Blacksburg)	087	tr-058	
FR179		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	013	tr-013	
FR182		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	054	tr-054	ST-48
FR236		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	149	tr-051	ST-9
FR255		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	071	tr-071	
FR342		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	152	tr-048	ST-13
FR356		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	083	tr-044	
FR402		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	053	tr-012	
FR403		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	023	tr-023	
FR406		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	155	tr-004	
FR409		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	056	tr-056	
FR413		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	035	tr-014	ST-1
FR434		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	090	tr-058	ST-47
FR460		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	009	tr-009	
FR469		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	047	tr-047	
FR486		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	029	tr-029	
FR495		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	061	tr-061	
FR505		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	032	tr-032	
FR513		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	031	tr-031	
FR529		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	156	tr-034	ST-35
FR535		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	150	tr-011	ST-40
FR545		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	043	tr-043	
FR546		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	069	tr-069	
FR548		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	157	tr-054	ST-38
FR549		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	001	tr-001	ST-3
FR581		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	033	tr-033	
FR602		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	050	tr-050	
FR615		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	057	tr-048	ST-13
FR623		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	137	tr-068	
FR650		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	159	tr-002	ST-9
FR659		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	006	tr-006	
FR702		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	135	tr-037	
FR729		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	064	tr-064	
FR740		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	163	tr-024	
FR751		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	103	tr-022	
FR798		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	158	tr-040	
FR846		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	106	tr-062	
FR861		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	144	tr-049	
FR913		M. Kist, Freiburg, Germany	Germany (Freiburg)	049	tr-005	
K1710		M. Kist, Freiburg, Germany	Switzerland (Basel)	027	tr-027	
K1910		M. Kist, Freiburg, Germany	Switzerland (Basel)	027	tr-027	
K2006		M. Kist, Freiburg, Germany	Switzerland (Basel)	027	tr-027	
K769		M. Kist, Freiburg, Germany	Switzerland (Basel)	027	tr-027	
NL027		M. Kist, Freiburg, Germany	The Netherlands	027	tr-027	
genome	630	genome sequence	Switzerland (Zürich)	012	tr-012	ST-5

**Tab. A7:** Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse. – Teil I

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_001	CD0051	glutamyl-tRNA synthetase	GCAGCAGGAGAAACAGCTAAA	TCTTCAGGAGACCAACCAACT	77384	77877	494	54.1	90.2%
cdiff_002	CD0119	phosphoglucomutase/phosphomannomutase mutase	TTCAAAGGGCTGTTTGGAA	TGGCTCATTATGATGCAATTT	162440	162872	433	54.5	85.6%
cdiff_003	CD0198	bifunctional GMP synthase/glutamine amidotransferase protein	CTGTTTGGAAAGGGGACAAGA	TAGCAGCATTTCATGTCCA	257060	257553	494	53.1	73.5%
cdiff_004	CD0399	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	TGAATTAATAGGAGCATTTGGGTT	ACCAAATGAACTCTTTGTTTTGT	471831	472296	466	55.6	83.8%
cdiff_005	CD0864	6-phospho-alpha-glucosidase	AGCAAGGATTGCAGGACTCA	AAGCCCCTGCCCCTTAGAAT	1040730	1041138	409	53.2	77.8%
cdiff_006	CD0882	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	TGATTGAAATTCTTTGGGATG	ATTGTGGAGGCATTGCCATA	1060922	1061323	402	53.8	98.5%
cdiff_007	CD1011	glucosamine-6-phosphate deaminase	ACCAAATGGAATGGCTGATG	TCAGTTTACTTGCTGCTGCTTC	1179438	1179859	422	54.9	73.3%
cdiff_008	CD1033	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	GCTGATATGCACTTTGCTCCT	TCACGCAACACAAGGACTGG	1207229	1207707	479	53.5	72.3%
cdiff_009	CD1188	putative glutamine amidotransferase	AGTGCTAAAAGGTGGCGGTGA	CCTTTTCCAAGCTGATTGACA	1389289	1389747	459	53.2	70.0%
cdiff_010	CD1304	putative mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase	AAATGAGCCAACCTGCCGAAA	GCAACTTGCTTAACAAACCATAA	1509837	1510297	461	54.2	99.1%
cdiff_011	CD1336	PTS system, maltose and glucose-specific IIBC component	GGTATCTTGCTGAACCTGA	CTTGCTCTCTACAACATAA	1550833	1551253	421	53.6	81.6%
cdiff_012	CD1343	glutamine synthetase	CAAACAATGTTGGATGGTATAAAA	TTAAATCCGATATTGAGTTCACAAA	1560472	1560916	445	53.5	81.4%
cdiff_013	CD1446	para-aminobenzoate synthase component I	GGAAGAATTTAAAAATGCAGTTCA	ACATTGTCATATGGTTCAATTACA	1677277	1677717	441	54.1	71.7%
cdiff_014	CD1535	putative 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase	CCAGCTTTTGAGTAAGCAGGTT	GGACATATCAAAGGCAGTTT	1780482	1780939	458	54.1	71.2%
cdiff_015	CD1550	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	GTCATTTTCATGGCAAGTTCTG	AAACCCCTTTGAAGATGCT	1798605	1799050	446	53.9	98.4%
cdiff_016	CD1582	histidinol dehydrogenase	CGGATGAACTTCAATCCAG	AAGTTCCAACCCAAACACCA	1834388	1834819	432	54.0	77.4%
cdiff_017	CD1594	putative O-acetylserine sulphydrylase	CGAAACAATGAGCGTTGAGA	TTCCCTCTTTTGCTGCAAGT	1849936	1850429	494	54.2	73.3%
cdiff_018	CD1665	cysteine synthase A	TGGTGAAGATTGGCACTTG	CCCTGAAGAAAATCCTGCAA	1938861	1939314	454	55.0	84.5%
cdiff_019	CD1749	putative 2-hydroxyacyl-CoA dehydratase	AAAGGGTGCTTCCAAGAAAT	TGCACGGTCAAAATTTAAACC	2026237	2026667	431	54.3	79.0%
cdiff_020	CD2031	succinylornithine transaminase	CATCAAAATATTCATAGCCAAAAA	GCAAAATGAAACAGCATTCAAAATA	2343022	2343427	406	54.1	77.2%
cdiff_021	CD2034	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	AATGGCATCAATGGTAAAGAAA	TGGTATTATTGGCGCAACTGGAT	2346461	2346928	468	52.8	69.3%
cdiff_022	CD2151	putative glutamyl-aminopeptidase	CAAAACAAAAGCTGCCACTGA	TCTTCTGCAACATCGACAAGC	2490941	2491398	458	53.4	79.6%
cdiff_023	CD2206	aldehyde dehydrogenase	CATCCGCTGCTGGAATCAT	GCGTGGCTCCAGATTATGTT	2555812	2556238	427	52.6	91.5%
cdiff_024	CD2232	anaerobic sulfite reductase subunit B	ATTCCACAACACATTTTCTTTCA	AAATGGATTGATGTATCCCTTTA	2583694	2584119	426	53.2	70.5%
cdiff_025	CD2241	N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	TGAACACCCAACCTCAAAGACC	GAAGGTGGAGCTGTTGGAAT	2592464	2592951	488	53.8	81.8%
cdiff_026	CD2319	putative ribulose-phosphate 3-epimerase	TGCAACCCTGGATTACTG	TGTGTGCAGACCAATGAAG	2682304	2682707	404	53.8	75.1%
cdiff_027	CD2410	pyruvate phosphate dikinase	GCTTTAGATTGCATTACACATATTCA	TTTGAAAAATTAATGAACTGGGTAGA	2781916	2782403	488	54.4	70.3%
cdiff_028	CD2459	glucokinase	TGCGTCTGAACCTAAAGTTGC	TTTCTGGAGCACATGGATTG	2836615	2837075	461	53.6	76.6%
cdiff_029	CD2514	threonine dehydratase catabolic	TTGATTAGCACTTAAATGTTTCCA	AAAAATGGAAGTAACAACAGCA	2901950	2902387	438	53.9	80.9%
cdiff_030	CD2630	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+)	ATAAGGGCAGCTTTTGCAAT	ATAGTTTTCAGAGTTCCATCACAGG	3039757	3040172	416	55.8	76.0%
cdiff_031	CD2715	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	AACCAATCTTATCTCCACATCA	TGATGAACCTTTTGCCGTATT	3141691	3142106	416	53.2	60.8%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil II**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_032	CD2804	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	TGTCAGCTGCTTCTTGCTA	GGAAGATACTTGGCAGGCTTT	3274587	3275035	449	54.5	77.6%
cdiff_033	CD2828	aspartate aminotransferase	TTTGCACCGTATTTTGGTGA	CATTTGCCCATAGCAACAA	3300547	3300957	411	53.3	84.8%
cdiff_034	CD3006	alcohol dehydrogenase	TTAAATCAGAAAATTGTGACTTC	TTTTAACAGCTCTTGAAGGTATTTA	3491717	3492165	449	55.4	77.8%
cdiff_035	CD3046	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	TGCTCTTTCAACCAACTTTTCA	GCTGGTGAAAATCAAGCAAT	3539769	3540185	417	54.9	68.4%
cdiff_036	CD3256	valyl-tRNA synthetase	TCCTGGGGAATTCAGTTG	GGTGGGTCATCAAATACCA	3812243	3812694	452	55.6	80.2%
cdiff_037	CD3396	DNA polymerase III DnaE	TTGTCGCCTTCAACTGAAAA	AGCAGGTTATGCAGGTCGTT	3973087	3973546	460	54.5	61.3%
cdiff_038	CD3434	cobyrinic acid a,c-diamide synthase	TTTAATAAAGCATTGTCCTGCT	TGTCCTTTTAAAGTCACAAAATA	4026714	4027161	448	54.7	68.8%
cdiff_039	CD3514	ribose-phosphate pyrophosphokinase	CACACCATGAGTACAACAAGCA	GGCTAAGGCAAGAGATCCAA	4106906	4107362	457	54.2	96.9%
cdiff_040	CD3627	putative dihydrodipicolinate synthase	TTCTATTCTCGTTACTTCAA	TTTTGGGTACTAATGGTGAA	4235851	4236271	421	54.1	78.0%
cdiff_041	CD0021	pyruvate carboxylase	CCTGTTCAAGATTGGGGATAA	CACCGCCATTAGATGCTTTT	34934	35368	435	54.8	71.5%
cdiff_043	CD0091	adenylate kinase	GACCTCCAGGTGCTGGTAAA	TTCTCCTTGGCATACATCACA	113247	113695	449	54.5	99.3%
cdiff_044	CD0107	aspartate aminotransferase	TGCAGCTGACTTAGAAAAACCA	TTGTATCAAGTGGAGCAAAAA	136934	137370	437	52.8	77.9%
cdiff_045	CD0130	S-adenosylmethionine synthetase	AAAGTTGGAGCTGGAGACCA	TTCTGAGAAAGCTCTCCA	174759	175215	457	54.5	61.7%
cdiff_046	CD0544	ornithine cyclodeaminase	ATGCTCAAAAAGGCAAAACCA	TTGGGCACAACCTTTGCATA	649241	649726	486	54.8	58.2%
cdiff_047	CD0558	glutaminase	TTGTGCTTGCTATGGCACTT	TGCAAGATTATTCGAATCTCG	665167	665600	434	54.4	71.9%
cdiff_048	CD0753	putative cysteine desulfurase	GCGCACTACAAAACCTTATCA	CCAACCTTCACCTATTGGCTGT	920767	921229	463	53.7	60.9%
cdiff_049	CD0879	putative carbohydrate kinase	AGAGCAAACAAAACGATTAGC	GGACCAAACCAATTCATC	1057047	1057477	431	53.9	65.9%
cdiff_050	CD0995	putative D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	TGAGAGATGAAAAATGGGAGA	AGATGCCCAATATGAGGTG	1160480	1160952	473	54.4	89.3%
cdiff_051	CD1747	adenosine deaminase	TTGAACCTTTTGGAAGATGCAAG	GACCAATCCTATCCGCCTTT	2024259	2024678	420	53.7	63.8%
cdiff_053	CD2027	N-carbamoyl-L-amino acid hydrolase	TTTCGCTGAAGAGGAAGGAA	CAACCAAATCAGCAGTCGTTT	2338742	2339157	416	54.6	78.7%
cdiff_054	CD2120	putative 2-nitropropane dioxygenase	GGAATGGGCGTTGGTATATCT	GTTTTCTCTTTCTATCCCATTTT	2454221	2454621	401	54.4	77.6%
cdiff_055	CD2128	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase	CAGCAGTTGCAGAGCCATGC	CGAGAGAAGAAAGACGAGAGAA	2465186	2465628	443	54.6	78.4%
cdiff_056	CD2130	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	TTTGCAACATAAGCTCTACTCCA	TCACCCACAAAGCATAATTCA	2466852	2467274	423	54.1	81.4%
cdiff_057	CD2166	peptide methionine sulfoxide reductase	CACCCACATCCAGAATCAAA	GATGGTGGACAATTTGGTGA	2505742	2506205	464	53.0	91.3%
cdiff_058	CD2213	putative carbonic anhydrase	AACTTCCAGTTTCAGGTGAT	GAGCTTTTGCTTAAGGCTATGA	2565516	2565916	401	54.8	63.1%
cdiff_059	CD2233	anaerobic sulfite reductase subunit A	TTGAATCAATATTCTCTGGCACA	AAACGCTTTTGAAGAAATGGAA	2584784	2585262	479	52.9	78.8%
cdiff_060	CD2240	N-acetylneuraminatase lyase	CAATTGCCCATCTACACCT	CAGGGGAAAACCTCATGCTT	2591694	2592167	474	53.1	60.3%
cdiff_061	CD2321	transketolase	CAGCTGAACCTAAACCACCT	GATGGTGGTAGCCATCAAGC	2683535	2683970	436	54.6	71.4%
cdiff_062	CD2329	putative transaldolase	AAAAGCACCTTCCCAATCCT	GATGGGCCAATAAGCGCAGAAG	2693227	2693715	489	54.8	67.9%
cdiff_063	CD2330	xanthine phosphoribosyltransferase	GATTCAACTACTGCCAAAGACTC	GAGATTTAAAGGAGAAAAGGTGGA	2693960	2694370	411	53.9	62.1%
cdiff_064	CD2335	inositol-5-monophosphate dehydrogenase	GCACGTGTTAAATCCACAA	CAGGAACACGTTCAAGCAAG	2700976	2701441	466	54.4	86.4%
cdiff_065	CD2382	putative aspartate aminotransferase	GCCCCATTCTCATACCATA	CTTCACCAGGAGGAAGTGGT	2748614	2749112	499	54.4	92.3%



**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil III**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_066	CD2575	ribulose-phosphate 3-epimerase	GCTTGTACAACCTTCGGCTACG	TCGATGTAATGGATGGACACTT	2979381	2979849	469	54.0	77.7%
cdiff_067	CD2588	guanylate kinase	TTCTTCATATGCACAGCTAAATCTC	CATCAGGTGCAGGAAAAGGT	2994323	2994750	428	54.9	67.1%
cdiff_068	CD2683	putative propanediol utilization protein	ATTTTAAACGCCTGCTGCAT	AGGGCAATATGCCTGTGAAG	3102772	3103198	427	55.5	67.0%
cdiff_069	CD2691	putative phosphoribosyltransferase	TCAGCATAGTCTATTCCATAACCAA	GGAAAAATGTTGACAGAAGAACAA	3110031	3110494	464	53.5	79.2%
cdiff_070	CD2692	putative aminotransferase	TTGGCAGTGGAGCTACAGAA	AGCCTTATTCCAGGCGTTG	3110970	3111402	433	53.0	79.8%
cdiff_071	CD2696	putative aminotransferase	AGCAAAAGGGATTGTGTGAAG	CCAGTGATTATCCCATTTGAAGC	3115562	3116035	474	54.3	94.4%
cdiff_072	CD2725	putative UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentap...	TTCTCTACACGCTCCTTGTTCA	AATGGGTGGAGGATTAGGATT	3161326	3161824	499	52.3	96.3%
cdiff_073	CD2733	putative aminotransferase	CAATTACTTGTATGGCTCCAA	CTCCAATGCCAAAGCTGTTT	3170110	3170511	402	53.5	60.7%
cdiff_074	CD2737	putative carbon-nitrogen hydrolase	GGATTGCATATTTTACTCTTTCCAA	GAGGAATCAATGTCAGAAGCTG	3175329	3175783	455	54.3	63.3%
cdiff_075	CD2813	tartronate semialdehyde reductase	TCTTCCTTACCACCAAGCCATA	TGGATTAGGAATAATGGGAAAGC	3284118	3284519	402	55.4	68.0%
cdiff_076	CD2819	putative amino acid racemase	TGGGGTTGAACCAAGAAAAG	CCAAGGCACCTTACTTCCACAA	3291737	3292153	417	56.2	70.6%
cdiff_077	CD2842	nitrilase (carbon-nitrogen hydrolase)	TCCCTGAAGCATTATACCTG	TGCTTGCCACTCTTCTCTTG	3324403	3324884	482	55.4	67.2%
cdiff_078	CD2859	putative D-aminoacylase	TCCAAAAGCACCACCTTTTCA	CCTGGATTTATTGACCCTCA	3343453	3343860	408	53.2	79.3%
cdiff_079	CD2994	ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	GCTACCATCTTTCCTTGACCA	CACAAGCTTTTTGGGAACAA	3477275	3477770	496	53.7	65.9%
cdiff_080	CD3009	putative pyridine-nucleotide-disulfide oxidoreductase	CCCTTCAGTGTGCTTTTCTT	CAGGAATGGGAACCTTCATTG	3495409	3495908	500	52.6	76.9%
cdiff_081	CD3093	putative glutamine amidotransferase	TTTTGTCCCTCCTTTATCTG	CCTGGCTATGAAAGGGCTTA	3595676	3596104	429	53.8	62.0%
cdiff_082	CD3099	putative amidohydrolase	CAAGCTGCTTTTCTGGAAC	CAGCTCATGCTTGTGGGCAT	3605497	3605935	439	55.2	67.0%
cdiff_083	CD3222	L-serine dehydratase	GAAGCGTTTGTCTCTGAAGC	CCCAAATGGGATGAAGTTTG	3771110	3771526	417	54.0	86.0%
cdiff_084	CD3237	putative proline racemase	GCATTGTTCAGTTCACAA	GGAAGCTCCAGCAGGAATAA	3790074	3790499	426	55.1	71.2%
cdiff_085	CD3282	putative formate acetyltransferase	CACCATCTTGACCATCTGGA	GGCAATAGCTTGTATGCAA	3843563	3844017	455	54.9	70.8%
cdiff_086	CD3404	putative cardiolipin synthetase	TCACCGAAAAATTGTTGTCA	TGCCCAGTATACAAAGGGATG	3982868	3983345	478	53.9	94.3%
cdiff_087	CD3532	putative amidohydrolase	CCGAACACACAATGTCACAA	CATTCTCCAGGACAAGGTCAG	4127692	4128100	409	53.4	81.8%
cdiff_088	CD3551	putative arginine decarboxylase	GACGATTGTGTAATGCTGGAA	GCTGTGGAATACAATCTGCAA	4145791	4146223	433	53.7	64.9%
cdiff_089	CD3640	carbohydrate kinase	TTCTTGCCACATATCCATCC	TTTGTGGTATTGCTATGCAACTT	4249527	4249961	435	52.7	84.7%
cdiff_090	CD3655	adenylosuccinate synthetase	CAATAACAGACGTATCTGCCACA	TCGGAAATGGAATAGTGTGGA	4266871	4267290	420	52.4	66.7%
cdiff_100	CD1767	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	TTGGAAAGAACTGGGGTTG	TTGACACAGCTTTTGCTGCT	2044678	2045078	401	54.1	63.9%
cdiff_101	CD1785	argininosuccinate synthase	TGCCATGGATGTACAGGAAA	GGATTGTCTCTCTGAGTCT	2067449	2067947	499	54.9	89.1%
cdiff_102	CD1792	putative L-threonine dehydrogenase	CTTCAGGAGAAAAGCTCATAGCA	TTCAATTGCTGCTTTTGGTG	2073895	2074295	401	54.6	74.6%
cdiff_103	CD1806	putative fructokinase	CCTTTATGGGATAGTGAGCAA	GCATATGAACCTTATCGACCT	2089661	2090085	425	53.1	73.9%
cdiff_104	CD1818	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	TGGAGATATGAAGCATCCAGAA	CCCCTGCTGTAATACCCAAA	2100515	2100942	428	53.2	60.5%
cdiff_105	CD1825	putative O-acetylhomoserine sulphydrylase	CGCATATGCAACTAAAGCAA	GAAGGCAATACTCCAGATGC	2111662	2112093	432	54.8	87.9%
cdiff_106	CD1826	homoserine O-succinyltransferase	CATTTGATGAAGCCAAAGGA	TCGCTATGACCCATTACGAA	2112482	2112911	430	54.2	81.0%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil IV**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_107	CD1833	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	ATGGCACATAGGGCAGTTAT	TCACTCTCTAGTGTAGGCAAT	2123423	2123922	500	53.2	81.1%
cdiff_108	CD2014	dihydroxy-acid dehydratase	TGGTATACCCATGCCTAAAG	TGAGTGGTGGTTTGCCATTA	2324527	2324975	449	56.7	84.1%
cdiff_109	CD2032	acetylglutamate kinase	AGAAGCTGCTGTGTCACCATT	TGGTGGAAGTGAATGAAAA	2344081	2344552	472	54.1	79.1%
cdiff_110	CD2069	putative molybdopterin biosynthesis protein	CACATCATCCGCCAGTACAA	GCAGCATGTGATGGTCTATT	2385199	2385637	439	53.9	76.2%
cdiff_111	CD2371	L-aspartate oxidase	ACATGTATCCCGCCATAAA	GTGGAATTGGTGGGCTTTTT	2736962	2737412	451	53.2	64.5%
cdiff_112	CD2464	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	CAGAAGCTCCTGCTCCAATC	GGGCTACAGGCCATTCAAGAA	2843897	2844344	448	52.7	76.9%
cdiff_113	CD2524	nicotinate-nucleotide adenyltransferase	CCTGGTCTAGTTCGGCTAT	CGCCATAAAGGCAAAATCAA	2917258	2917670	413	54	88.5%
cdiff_114	CD3581	putative pseudouridylate synthase	TTTGCAAAACATCAAAAGCA	TGGATATTTGTCAGGTGGATGA	4182033	4182482	450	53.8	67.1%
cdiff_115	CD2610	tryptophanyl-tRNA synthetase	TGTTTTTCGGCTTTTCTGC	TACCCAAAAGGTGGAGCAAG	3016077	3016480	404	53.9	62.6%
cdiff_116	CD2659	prolipoprotein diacylglycerol transferase	CCTCCATGTGCTTCTCCATT	TTTGGCATAGACATCATGTGG	3068787	3069187	401	54.1	97.7%
cdiff_117	CD2739	putative aspartyl-tRNA synthetase	AGTCGTCAGCTTTGCCTTTT	CGCATTACCACAATCACCAC	3178480	3178904	425	55.6	78.4%
cdiff_118	CD2836	putative peptidase	TGTTGCCTACCCCTAACCAG	AAATGGATTGGAGGTCACG	3314695	3315179	485	54.9	97.9%
cdiff_119	CD3041	proline iminopeptidase	GGTCTTCTCAGGCACTCTGG	TTCATGGAGGTCCAGGTTCT	3533874	3534366	493	55.3	98.7%
cdiff_120	CD3164	ribonuclease R	CGCTAGATACAACACCCTCAAA	AAGAGGAAGTACATCCAAAAGCA	3696298	3696705	408	54.7	73.3%
cdiff_121	CD3248	polysaccharide deacetylase	TGATTTGGTCCAAGCTCCTT	TCTGACAATTCAAAAATGCCTA	3803456	3803904	449	53.7	63.7%
cdiff_122	CD3307	ribonuclease PH	TGTTGCATGTTCTCTGCAT	ACAGGGGACAGGAGAAGAGA	3872080	3872512	433	54.5	88.3%
cdiff_123	CD3393	putative RNA methyltransferase	TGGAAGTTTGTTCATTGTC	TAGGGATTGTGGAGGGTGTCT	3968189	3968624	436	53.6	88.0%
cdiff_124	CD3408	putative DNA mismatch repair protein	TAGCCATACAGGTCGCATCA	AATTGCCTGTGGTGTTTTGA	3988729	3989132	404	55.1	83.0%
cdiff_125	CD3481	low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	TTTTTACTATTTTCGTTGACAGAATACA	GAAGCCCTATGGCTGAGGCTA	4068661	4069065	405	53.3	71.7%
cdiff_126	CD3557	BirA bifunctional protein	TTCGTTACACTTGCTCCTGCT	GGGTGTCACGTGCAGCTAT	4158947	4159349	403	54.3	79.3%
cdiff_127	CD3592	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	TTTTGGTCTCCAACCTCTGC	GAGCAATACGTTGCCACAAA	4198172	4198644	473	55.6	72.8%
cdiff_128	CD3626	2-keto-3-deoxy-6-phospho-gluconate aldolase	TCCCTCCACTTGCTAAACTG	ATGTCAGAATGTGGGGCTCT	4234898	4235357	460	55	60.4%
cdiff_129	CD0045	putative sugar-phosphate aldolase	TGGGAGAGATGAACAACTGG	GATGGACCAACTGCAATTACG	69777	70181	405	54.2	62.7%
cdiff_130	CD1784	tRNA pseudouridine synthase A	TCATGCAAGAGGACAAGTGG	TGGAGCTCTTCTTTTAGACCAA	2065966	2066440	475	52.1	99.1%
cdiff_132	CD1999	flavodoxin	TCAGCTAACGTTTTCGCTAATTC	TGTTTATTGGAGTGGAACAGGA	2309725	2310132	408	56.3	72.9%
cdiff_133	CD2053	diaminopimelate decarboxylase	TCCATATGCACCAGTTGATGT	TGGAGGAGTTGGCGTTTATT	2366513	2366948	436	54.8	62.2%
cdiff_134	CD2073	xanthine dehydrogenase, molybdenum binding subunit	ACCCATCATCACACCACCTT	CGGTTACAGGAAATGCAACA	2389216	2389622	407	54.7	68.6%
cdiff_135	CD2110	fructose-6-phosphate aldolase 2	TTCCAAAAGTATTCTCCCAATCC	TGTA AAAATACCTGTAACACAAGATGG	2439427	2439827	401	54.3	60.4%
cdiff_136	CD2118	threonine synthase	ATGCCAAACAAATGGGTCTT	CAGAAAACCTGAATGGACTTGC	2452476	2452940	465	52.6	74.2%
cdiff_137	CD2138	uridylate kinase	CCATCTCAGCAGCACGTAAA	TGGAGAAGCATTAGCAGGAGA	2474592	2475004	413	56.7	64.7%
cdiff_138	CD2158	4-aminobutyrate aminotransferase	CATCTCCTGCAATTGGCTCT	GTGCAGGCTCTGCAAAATGTA	2497224	2497706	483	54.9	77.3%
cdiff_139	CD2164	L-lactate dehydrogenase	GTTCAGGGCATGTTGGTTCT	TTGATTGTTGAGCGATTCCA	2503164	2503652	489	54.6	84.5%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil V**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_140	CD2200	putative histidinol-phosphate aminotransferase	GCAACACGATTTCAGAGAA	TTGTAACCCAACATTTCATCA	2548265	2548708	444	53	69.4%
cdiff_141	CD2217	3-dehydroquinate dehydratase	TTTCATTTTGGCGCATAACA	AGAGTGGCGAGTTGATTTT	2568797	2569197	401	52.9	80.7%
cdiff_142	CD2231	anaerobic sulfite reductase subunit C	CACATGCTCCACAATTACACA	CAAGTGAGTACGGAAATGGA	2583047	2583448	402	53.9	61.7%
cdiff_143	CD2236	putative glucokinase	CCAAGCATTCTGCATCATT	GCTTGGCGCAGGTAGAGGTG	2587440	2587934	495	53.6	73.4%
cdiff_144	CD2252	L-lysine 2,3-aminomutase	ATGGAATCCTGCATTGCT	GGACCCAATGGGAGAAGAGT	2609150	2609628	479	54.5	72.1%
cdiff_145	CD2278	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase	TTCCCCATGTAAAGGTCCG	TGGGGAATGTAAAGTGGGATA	2643152	2643599	448	54.5	68.8%
cdiff_146	CD2341	gamma-aminobutyrate metabolism dehydratase/isomerase	CTGCTAAAGCTGCTGCTCCT	GTGCTCAACCTGACCCAGAT	2708190	2708651	462	55.3	70.0%
cdiff_147	CD2425	phosphate butyryltransferase	TCGCAGTTTATAGGATTTCCA	GGCTGTGAAATCAGCAACAG	2800807	2801231	425	53.8	82.5%
cdiff_148	CD2491	mannose-6-phosphate isomerase	TCGCCAACAACTGGTGAAAT	TGTTCTTTGCATATAGCATGT	2873522	2873965	444	53.6	90.9%
cdiff_149	CD2500	argininosuccinate lyase	AGCTCTGCACCATCTGGATT	TGCCAGGCTATACTCATCTT	2885144	2885564	421	54.2	94.5%
cdiff_150	CD2515	aspartate aminotransferase	TACTTGATGCAGGTCTGTGGA	AGCAGCTGTAGCACCTTCAA	2903812	2904242	431	54.1	61.7%
cdiff_151	CD2558	phosphopantetheine adenylyltransferase	TCAGCATCAAAGAGCAAAACC	GCAGGAAGTTTTGACCCAAT	2958631	2959031	401	53.5	63.4%
cdiff_152	CD2569	alpha-mannosidase	CAGGAAGAGCTTCTGGAGAAAA	TTCGTCGAGCATTGCACTAT	2972900	2973303	404	53.6	73.6%
cdiff_153	CD2587	coenzyme A biosynthesis bifunctional protein	TTCTCAAGCAACGCTTTAACTTT	CAGCACAAAGATTGTATGAAGCA	2992704	2993142	439	52.8	80.3%
cdiff_154	CD2611	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	CCACCTTCCATTTCTCCACA	GGGAATTTTGAAAGGTAAGAATG	3017203	3017631	429	55.5	61.5%
cdiff_155	CD2676	putative acetyl-CoA acetyltransferase	TAGCTGCCCAATCAATCACA	TTAACATAGCCGCACCATCA	3092353	3092835	483	54.8	71.3%
cdiff_156	CD2695	asparagine synthetase AsnA	ATCCCAATTCAATTCCCAAT	TGGGTTTGAAGTTGGTAGTGG	3114062	3114488	427	53.2	86.8%
cdiff_157	CD2708	shikimate 5-dehydrogenase	AAAAGCTTCTGCTCCTGGT	AATTATGGGTGCTGGTGGTG	3132262	3132682	421	54.3	86.3%
cdiff_158	CD2882	6-phospho-beta-glucosidase	CAGCTGCTTTAGTACCAAT	GGGTGCAATACCTTGCCAT	3370111	3370547	437	53.9	85.0%
cdiff_159	CD2954	V-type ATP synthase subunit D	TGCAAGAAGCTGTGCACTTT	TCCAACACGTATGGAATGA	3430618	3431068	451	56.2	71.0%
cdiff_160	CD2958	V-type sodium ATP synthase subunit E	TTTCTGCTGCAATTTGTTC	AAAGCTTGCAAGGCAGAAAG	3435675	3436078	404	53.2	62.1%
cdiff_161	CD2995	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain	GCTTTGAGTTGGTGCTACTGC	AAACCAGTGCCAACGGTAAG	3478204	3478626	423	53.5	93.5%
cdiff_162	CD3028	putative phosphosugar isomerase	TGCACATGCAATAGATCTCCT	TGAAATTGCAAAATTGTGAAGG	3516599	3517001	403	54.4	63.5%
cdiff_164	CD3070	glycosyl hydrolase	TCATGCGCTTCTTTCATCAG	TGGGCAGGAGCTCAAAAGTA	3565937	3566349	413	56.2	70.5%
cdiff_165	CD3084	glycerate kinase	TTTTCCCAAAACAGCGGATTA	GATGGTGGTGAAGGGACAGT	3582120	3582597	478	54.7	68.9%
cdiff_166	CD3091	trehalose-6-phosphate hydrolase	AGGCGCAAAATGGACTAATG	CCCATTGCATAGGAGTACGG	3593179	3593582	404	55.1	78.3%
cdiff_167	CD3106	putative phospho-sugar aldolase	TTTGATAGACAGTGCTAATCTTGATG	CATCATTTCCCATTTTCATCATTT	3614332	3614738	407	53	77.0%
cdiff_168	CD3112	putative amidohydrolase	CCATAGCTGCATCGACCTGA	CATGAAATCCCGAAATTGG	3622646	3623060	415	55.4	75.5%
cdiff_169	CD3121	putative flavodoxin	TGCATGGAGATTGCCAATAG	CACATTTTCCACAGCCAATG	3634731	3635158	428	53.7	67.1%
cdiff_170	CD3128	beta-phosphoglucomutase	TTTAGCATCTTGCTCCCTTCA	TTTGAAGCTTGGCATGAGA	3643405	3643824	420	52.5	81.5%
cdiff_171	CD3172	triosephosphate isomerase	CCAGATTGGCTCATATGCAA	TGCAGGAACTGGAAAATGC	3707190	3707679	490	54.2	66.1%
cdiff_172	CD3177	D-hydantoinase	TGATGTAGCTTCTGCCTCCA	CAGGCGTTACTAAGACAGCAGA	3716815	3717284	470	55.7	78.2%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil VI**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_173	CD3226	dihydrodipicolinate reductase	GGTTTGTGTTGCAGCTAGAGG	AACGTTTGGCAAAACCTCTTT	3775558	3775975	418	54.5	92.3%
cdiff_174	CD3253	putative folylpolyglutamate synthase	TGCCAAAGATTTTGCTCCAT	TAGCGTACGAAAAGGCTGGA	3806940	3807373	434	52.5	78.9%
cdiff_175	CD3275	putative phosphosugar isomerase	TTTTCCGTCCAACCAGAAAG	TTGTGGTGAAGAAAATCTGGA	3834209	3834658	450	52.9	78.5%
cdiff_176	CD0036	acetoin:2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase alpha...	CCAGGAGCTGCACCTACACA	GGGTCTTTGCTTTCCATGA	58829	59253	425	54.0	63.8%
cdiff_177	CD0039	E3 component of acetoin dehydrogenase enzyme system (dihy...	TGGTGGAGTGATTGGTTGTG	CCCATTTTAAAGCAGCATGA	62546	62965	420	53.6	63.1%
cdiff_178	CD0065	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	TGCAGAAGGTGGTTGTGCTA	AGTTGCAATAAGCCCTGGAA	89053	89479	427	54.6	88.2%
cdiff_179	CD0109	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activatin...	AGCATAGTTGATGGACCAGGA	TCCTTTGATTGATGACCCTCT	140429	140846	418	54.3	63.7%
cdiff_180	CD0112	phosphate butyryltransferase	TGGCAGTTGAAATGGCTAGA	TTCTTTTGCGCATATTGCAG	156345	156793	449	55	60.8%
cdiff_181	CD0116	putative subunit of oxidoreductase	CCAGCTGCTGTACAGGAAT	TGGAGCTAGTCCCCAGTTTG	160506	160952	447	55.8	60.8%
cdiff_182	CD0154	4-hydroxyphenylacetate decarboxylase, activating subunit	TGGTGTGCAAAATCCAGAAAG	ACATGCACCTGTTTCAATGG	205119	205523	405	55.3	71.9%
cdiff_183	CD0179	NAD-specific glutamate dehydrogenase	AACAGCTGCTACTGGATTGG	GAAACTGTAACCTCCACCAGCATT	237352	237855	504	55.3	86.0%
cdiff_184	CD0188	putative ketopantoate reductase	TTTTGGAGTAGTGCTGTAGGA	GTTACCAAAATACAATTATCCCAT	246027	246444	418	52.2	70.6%
cdiff_185	CD0209	putative sugar-phosphate kinase	GGAAACCAATGGAGGCTTA	TTCTCCAACGTCCACATTCA	273020	273456	437	54.8	90.1%
cdiff_186	CD0218	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	GCAGTAGTTATGGGTTCAAAATCA	TCAAATCCTCTTTTAAATTTGGGTAT	281732	282137	406	55.2	60.6%
cdiff_187	CD0222	bifunctional purine biosynthesis protein	ACGTCTCTGCTGCCAAAAC	CCTACCCACATGAATTAGCA	286321	286773	453	53.8	66.5%
cdiff_188	CD0274	putative 1,3-propanediol dehydrogenase	CATTATGGATGCTGCCAAGA	GCTGTACCCGCTGTACCAAT	336035	336517	483	54.4	62.7%
cdiff_189	CD0295	putative iron-sulfur-binding protein	TCATGAAGCAGCAGGTTTTG	CATGGGCAATTGGTCTACCT	356746	357161	416	56.5	75.1%
cdiff_190	CD0299	putative ribokinase	TCACAAAAGTTCTGGTGTGCT	CATGCTTGATTCTCTACCA	360409	360827	419	53.1	98.3%
cdiff_191	CD0333	putative manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	TCAACATCAAATGCGTTAGC	CCGGGCTTCTTTTATCTGCT	402224	402635	412	53.5	88.5%
cdiff_192	CD0389	6-phospho-beta-glucosidase	TGATACGCAGGTTTTTGGTG	CCCCAAAGTTCAACGCCATC	460108	460560	453	52.8	71.8%
cdiff_193	CD0397	subunit of oxygen-sensitive 2-hydroxyisocaproyl-CoA dehyd...	AACCAAGCAGCTGGAGTAGC	CCATAGTCTTCCGTTTTCAGC	469251	469667	417	53.3	61.9%
cdiff_194	CD0444	putative pyridoxal-phosphate dependent enzyme	GCAGCTGTAGCATCACAAAGC	TCCCAAAACCTGTATGTCCTG	527863	528346	484	55.1	68.4%
cdiff_195	CD0472	putative iron-sulfur flavoprotein	TTGGTAGCCCAACTTATGGAA	CCCCTGCTCCTCCATCTAT	563094	563515	422	53.5	60.4%
cdiff_196	CD0489	putative phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide ...	AGCTCAAGACCTTTTTCAGTCA	ATTTGACCCAGGCGAAAATA	579613	580050	438	54.8	66.2%
cdiff_197	CD0528	putative amidohydrolase	TTCCATCATGTGGAGCAGAA	TGCAAAGCAGATGCAAAATTC	633570	634044	475	54.6	65.5%
cdiff_198	CD0580	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GCAAGGGCAGAAGTTGAGAG	GCATCTTTTCCACCAAGCTC	693513	693991	479	55.5	61.4%
cdiff_199	CD0715	putative phosphate butyryltransferase	GGTTGGAAATGAAGGCAAAA	TCTTTAGCTGCCAAACATGC	874910	875311	402	53.6	85.0%
cdiff_200	CD0716	putative bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acety...	GGGGTTATGTGGAGCAGATG	CATAGAACCACCCCAACCAT	876476	876941	466	55.3	86.6%
cdiff_201	CD0717	putative carbon monoxide dehydrogenase accessory protein	TGTTTGTGAAGACGGATACA	GCATCTACACCTTGGGCTGT	878584	878995	412	55.5	73.1%
cdiff_202	CD0718	formate--tetrahydrofolate ligase	ACTCCAGCAGGTGAAGGAAA	CAAACAGAACGCTGCCATTA	879740	880171	432	56.3	62.0%
cdiff_203	CD0719	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	CCAAAGAAGCAGTACCAGGTG	GCAGCTCTTAAACACTGAACTCC	881375	881798	424	55.0	82.9%
cdiff_204	CD0720	FoID bifunctional protein	GCACCGGAAAAAGACGTAGA	CCGTGGAACTGGAGTTATC	882404	882848	445	55.6	68.3%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil VII**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_205	CD0722	putative methylenetetrahydrofolate reductase	AGCGTAGGAGACCATCCACA	CCCCTGCCATTTTATTCT	883996	884443	448	55.0	73.0%
cdiff_206	CD0724	putative carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthas...	GGTGGTATGACAAAGGCACA	CATCCATAGGTACAACCCGATT	886260	886695	436	55.0	60.5%
cdiff_207	CD0727	putative carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthas...	GCTGATGCTGGCTCAAGATT	GATGCCCCGTTGATTATGTC	889529	889971	443	55.3	91.8%
cdiff_208	CD0737	histidinol-phosphatase	TGGGTCGGAAGTGGAATTTA	CTGCACAGTGAGAATCAGAAACC	899343	899842	500	52.7	99.7%
cdiff_209	CD0741	glycerol kinase	TTGACCAAGGAACAACAGGA	TGTTCTGCAAGTACTTCTCCA	903955	904433	479	54.1	64.1%
cdiff_210	CD0753	putative cysteine desulfurase	GCGCAACTACAAAACCTTATCA	CCAACCTCACCTATTGGCTGT	920767	921229	463	53.7	60.9%
cdiff_211	CD0758	pyruvate formate-lyase activating enzyme	CCTTAGTGGCATCAGGAACA	ACTGCCTCTGGTGGTGAATC	928226	928679	454	54.2	98.6%
cdiff_212	CD0768	sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	TGGCTTATGTTGTGGAGGA	TGCTTGCTTCCCACTCTACC	939175	939610	436	53.9	68.8%
cdiff_213	CD0794	NH3-dependent NAD(+) synthetase	AATGAGGCAAAATGCAAAAGG	TCAACTCCACCATCACCAAA	965178	965602	425	54.4	88.4%
cdiff_214	CD0797	putative hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	AGCCCAAAAGCAATACCTCA	TTGCTTAGGGTCAGCAATCC	968259	968663	405	54.4	67.9%
cdiff_215	CD0802	putative CoA-transferase	TTGGGCAAGCAATATGGAAT	TGGAGTGGATGCAAGCATTGTC	975291	975742	452	54.3	80.4%
cdiff_216	CD0805	electron transfer flavoprotein alpha-subunit	GGAAGAAAGCTTGCTGACCA	GCCATAACTCTGGACGAAAC	978022	978440	419	55.4	63.3%
cdiff_217	CD0818	putative 6-phospho-beta-glucosidase	ATGGGGAGCATCATCTTCTG	TGAGGTTGCCAATACTTTACCC	992775	993230	456	54.1	79.9%
cdiff_219	CD0864	6-phospho-alpha-glucosidase	AGCAAGGATTGCAGGACTCA	AAGCCCACTGCCCTTAGAAT	1040730	1041138	409	53.2	77.8%
cdiff_220	CD0888	arginine decarboxylase	GAATGGCACAACTCAAGCAA	TTGTGTCAATGCTCTCCAG	1070358	1070796	439	53.5	65.9%
cdiff_221	CD0890	spermidine synthase	TAGGTGGAGGTGATGGAGGT	CCAAACAACCACTGACCAGA	1072320	1072776	457	53.9	82.4%
cdiff_222	CD0893	iron-dependent hydrogenase	ATGGGGTTACAACCAGGTCA	GGAGTACTACCGCATACAT	1074840	1075327	488	55.6	71.6%
cdiff_223	CD0989	2-isopropylmalate synthase	CTTGTAACGGTGCAAGTGAA	ACAGCTCCTCTTTTCCAGA	1153723	1154137	415	54.8	65.6%
cdiff_224	CD0994	putative aminotransferase	AAGCACTGGGATTACCACCA	CCATTGTCTATTGGAATCTCT	1159350	1159752	403	55.2	66.3%
cdiff_225	CD1003	fumarate hydratase	AGCGAAAAGCGAAAAGAGTG	ATAGGAGGGCATGGGTTAGG	1172257	1172706	450	54.5	79.0%
cdiff_226	CD1005	NAD-dependent malic enzyme	TGGAGCCTGTATTGGAGGT	CCTGGACCTGAAACACCAAT	1173992	1174418	427	52.4	63.7%
cdiff_227	CD1054	butyryl-CoA dehydrogenase	CAAAATGCAATAGCTGGTGAC	GCCATTGCTGCTTCTACTCC	1247389	1247872	484	55	82.5%
cdiff_228	CD1056	electron transfer flavoprotein alpha-subunit	GACCTGCCTTTGGTGGAAT	TCAGCATCTTCCATACCAGCTA	1249322	1249778	457	54.4	63.7%
cdiff_229	CD1059	acetyl-CoA acetyltransferase	TGGTGGAGCTGAAAATATGA	TCCTGATGCATTACCAGCAG	1252107	1252515	409	55.5	98.0%
cdiff_230	CD1081	molybdopterin biosynthesis protein	GAAAGATACCACAGGTGCAA	TCCAACAGAAACACCACTG	1273854	1274317	464	52.9	64.7%
cdiff_231	CD1120	glycerol dehydratase	TGGAAGGGAATCTTTGGA	TGGAGGGTTTGCTGGTACAT	1316441	1316842	402	53.8	81.2%
cdiff_232	CD1129	putative dephospho-CoA kinase	CAGGAGGAATAGGCTGTGGA	AAGTGCTTCCTGCTTACTAC	1329250	1329692	443	53.9	71.6%
cdiff_233	CD1153	methylglyoxal synthase	GCATTAGTAGCACATGACCAAA	AAATACGTTGACTTTTGCTTTTC	1351749	1352151	403	54	72.3%
cdiff_234	CD1171	electron transfer flavoprotein beta-subunit	ATGATGGGAGCTGATGAAGG	TCTGTATTGGCTTTGGAGGA	1370254	1370741	488	53.2	63.1%
cdiff_235	CD1178	fatty acid/phospholipid synthesis protein	GCGCAAAATGCAGATTGTAAA	AAGTGGAGCTCCCCATACT	1378677	1379104	428	53.6	69.9%
cdiff_236	CD1179	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III	TGCCAAAGAGTCTGAAGCAA	CCTTTACCATCAGAGCCATA	1379435	1379857	423	56.0	86.4%
cdiff_237	CD1205	geranyltransterase	TGCCTAAAGAAGAAGGGTATCAA	TTCAATTGTGTTATTTTCGCTTT	1403238	1403683	446	55.1	71.8%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil VIII**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_238	CD1220	ADP-ribose pyrophosphatase	CCAGGGCAAGGATATCAAAA	TTTTTGCATCTTCAACGTCA	1418554	1418962	409	54.5	80.8%
cdiff_240	CD1279	cysteine desulfurase	AGCAGGTGGTTCAGAAAGTGA	TTTCTTGCTCCACCATGG	1485486	1485976	491	53.7	72.3%
cdiff_241	CD1315	riboflavin biosynthesis protein	TGGTGACACAAAGGACATCAA	GCCATATCACCTGGGATACTA	1524854	1525309	456	53	70.4%
cdiff_242	CD1334	adenylosuccinate lyase	GACAGATATTGTAGCAAGGACATGA	TTGAGCAGCTTGGAAAGTGTG	1547916	1548353	438	54.2	84.1%
cdiff_243	CD1353	putative pyridoxine kinase	AAAAGTTTCAACATAACTCCATCA	TCACAGAAGAAATGAGACAGGAA	1569559	1570005	447	53.8	71.0%
cdiff_244	CD1382	glycerol kinase	ATGAGCGCATGTTATCAGGA	TCCTAAAATTGAACCCCTAGCA	1600779	1601194	416	55.8	68.8%
cdiff_245	CD1387	putative allophanate hydrolase subunit 2	TGTGTCAATAGCTGGTGGA	AATCGGTTTTCCATGACCAG	1606065	1606473	409	54.1	76.9%
cdiff_246	CD1402	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	AAAAGTAGAGGTGGATGAAGG	TGTCCACAGAATAAGGATGGA	1621881	1622336	456	52.8	98.8%
cdiff_247	CD1445	para-aminobenzoate synthase glutamine amidotransferase co...	GCTGGTATTGCATAGATATTGTTG	CATGTACCCCTTCTCTAGCTTCTG	1676320	1676725	406	54.2	76.4%
cdiff_248	CD1449	putative GTP cyclohydrolase I	TTGGAGAAGACCCAGATAGA	TACACCTCTCATTGTCATAC	1679633	1680045	413	55.3	99.5%
cdiff_249	CD1451	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylhydropteridin e pyroph...	TCAAGAGCATGTGAACCTTTTGAA	TCTTTCTTCAGCAGATAGGAGGTT	1681428	1681832	405	54.9	64.0%
cdiff_250	CD1458	putative flavoprotein	TTTTCATAGTGTTTGTGGGAGTACA	ATTCCTCATATGTTGAGCAAA	1687917	1688327	411	53.7	63.8%
cdiff_251	CD1468	putative iron-sulfur protein	TTTGCCATGATGAGAACGAG	GCTGCTACCATTGCTTCACA	1698176	1698666	491	54.2	67.0%
cdiff_252	CD1495	pyrroline-5-carboxylate reductase	AGCGCTATGATAGGGGGAAT	TATGCTGGTGCAGAACCACT	1731943	1732433	491	53.4	75.2%
cdiff_253	CD1502	putative deoxyribose-phosphate aldolase	TCAGTTTGATACCAACCATCA	ACTCCCCCTGCAGCTTTTAT	1739922	1740370	449	53.8	65.3%
cdiff_254	CD1508	putative iron-sulfur cluster-binding protein	TAAATGTAGCAGGGGGTGGA	TTGTAGTAATTGCATTTTGTGGA	1745685	1746086	402	53.5	63.0%
cdiff_255	CD1512	putative pantoate--beta-alanine ligase	CAGCCAATTGTTGGGCATCC	TCAAAGATTGGAGAAAACATGG	1750667	1751092	426	54.1	63.2%
cdiff_256	CD1525	putative iron-sulfur protein	AGCATCACAAAATCCATATGCT	GGACAAAGTTCATGGCAACA	1768238	1768645	408	53	66.9%
cdiff_257	CD1536	putative oxidoreductase	TCAGGAGCTGGTCTTCCAAT	GGGCTTGTTCCAAGTGACAT	1783283	1783764	482	54.2	73.5%
cdiff_258	CD1543	putative acyl carrier protein phosphodiesterase	TGCTAAAAATTTAGACGATAAGGA	TGCTTTTCTATTGCAGCTTG	1792685	1793090	406	53.8	67.0%
cdiff_259	CD1547	putative ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	CCAAGATGGGAAGATGGTTT	TTCTTCAAGAGCTTGCTTCATC	1796045	1796497	453	51.7	60.3%
cdiff_260	CD1550	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	GTCATTTTCATGGCAAGTTCG	AAACCCCTTTGAAGATGCT	1798605	1799050	446	53.9	98.4%
cdiff_261	CD1552	putative imidazole glycerol phosphate synthase subunit	TGGAAGAGTTGTAAAGGGAAAA	CCCATTCAATTGCATCCAG	1800404	1800834	431	54.3	70.6%
cdiff_262	CD1565	ketol-acid reductoisomerase	GGAAGTCAAGGACATGCACA	CACCTGCTCTTGTTGCTCCT	1811555	1812014	460	55.6	81.4%
cdiff_263	CD1580	homoserine dehydrogenase	AAGTGCTTTTGTAGACCTGTTTT	TTTTTCGCAATATCCTTTATCTTTT	1832316	1832751	436	52.3	73.2%
cdiff_264	CD1585	putative N-acetylglucosamine kinase	TCTTGGATTTCCTTGGAGCAA	TATCCATGCTTAACCTCTCCT	1838407	1838815	409	53.4	62.4%
cdiff_265	CD1594	putative O-acetylserine sulphydrylase	CGAAACAATGAGCGTTGAGA	TTCCCTCTTTTGCTGCAAGT	1849936	1850429	494	54.1	77.6%
cdiff_266	CD1600	hydroxyethylthiazole kinase	CCTGTGTGTTTGGACCCAGT	TTGTAAGAACACCCATTGTTGC	1855846	1856248	403	54.9	78.3%
cdiff_267	CD1623	putative nitric oxide reductase flavoprotein	GCGGTTTATTGGGACTTGAA	CCCCTGCTATTTTCCCAT	1880751	1881194	444	55.1	76.9%
cdiff_268	CD1632	asparagine synthetase	TGGATGACCCATATAGCAGACC	ATCGCCTTGAAGCCATGTAT	1891694	1892139	446	52.9	78.8%
cdiff_269	CD1657	putative bi-functional glycine dehydrogenase/aminomethyl ...	ATGTGCATCTCCAACGACAG	TATGCACCAGCACCAAGAAA	1923689	1924102	414	53.1	77.9%
cdiff_270	CD1665	cysteine synthase A	TGGTGAAGATTGGCACTTG	CCCTGAAGAAAATCCTGCAA	1938861	1939314	454	55.0	84.5%

**Tab. A7: Übersicht der anhand des *C. difficile* Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse – Teil IX.**

Lokus	ORF	Annotation	Primer_F	Primer_R	Position ( <i>C. difficile</i> 630 Genom)		Produkt- grösse (bp)	dHPLC Analyse- Temperatur (°C)	dHPLC Abdeckung
cdiff_271	CD1697	riboflavin synthase beta chain (6,7-dimethyl-8-ribityllum...	GCCATTTCTAGCGATTTCAT	TGAAGGAAAACCTATTGGAAAAGA	1969531	1969959	429	55.4	70.7%
cdiff_272	CD1702A	putative thiamine biosynthesis protein	GGGGGACTTGGTTCCAATA	TCATTACAAAAATCCCCACA	1978190	1978617	428	52.1	61.5%
cdiff_273	CD1709	putative molybdopterin-guanine biosynthesis protein	TTATTTTGGAGGAGGCGATTT	TCCAGAACACAATGGTTGTAAC TT	1984882	1985285	404	53.5	60.1%
cdiff_274	CD1715	putative molybdenum cofactor sulfurase	TGGCGAAGGTAGTGTCAATAAA	TCATTACATTTATAATTCCTTCTTT	1988875	1989286	412	55.8	74.6%
cdiff_275	CD1740	sarcosine reductase complex component B alpha subunit	AGAGCCTAGAGTTAAAATTGGAGATG	CATATGCTACTGTGGCAGGTC	2016157	2016557	401	55.1	62.9%
cdiff_276	CD1747	adenosine deaminase	TTGAACTTTGGGAAGATGCAAG	GACCAATCCTATCCGCCTTT	2024259	2024678	420	53.7	63.8%
cdiff_277	CD1760	putative iron-sulfur protein	GGAGATGGCTCTGGTGTGTT	ATTGTACATGCCCCATTTGC	2038991	2039394	404	54.9	60.9%
cdiff_278	CD1785	argininosuccinate synthase	TGCCATGGATGTACAGGAAA	GGATTGTTCTCTGGAGTCT	2067449	2067947	499	54.9	89.1%
cdiff_279	CD1792	putative L-threonine dehydrogenase	CTTCAGGAGAAAAGCTCATAGCA	TTCAATTGCTGCTTTTGGTG	2073895	2074295	401	54.6	74.6%
cdiff_280	CD1806	putative fructokinase	GAGGAGCTCCAGCAAAATGTT	GATTGCTCACTATCCCATAAAGG	2089254	2089683	430	53.7	77.5%
cdiff_281	CD1832	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	GGTGCAGGATTTTGTAGAGG	TTACCTGCTGCATGACTTGG	2121618	2122084	467	54.3	68.1%
cdiff_282	CD1834	chorismate synthase	ATGAGACCAGGACATGCAGA	CGGCAGGAACAGAAAACAAT	2124948	2125386	439	54.6	63.8%
cdiff_283	CD1839	putative prephenate dehydrogenase	AGGACTAGGAGTTATAGGAGGCTCT	AATTTGCGCCATTAAAACTTG	2128365	2128765	401	52.8	62.6%
cdiff_284	CD1907	putative ethanolamine/propanediol utilization propanol de...	TTGGAGAAGGTTCACTAAAAGC	CATCCATCCCTGTATCTGCTG	2208516	2209007	492	54.4	64.8%
cdiff_285	CD1909	putative ethanolamine/propanediol utilization protein	TAATATTTATGGGAAAGACAGGTAGTG	AAATAATTTTCAAGTCCAATATTATCAAC	2210221	2210621	401	54.2	68.6%
cdiff_286	CD1913	putative ethanolamine/propanediol ammonia-lyase heavy chain	TAGCAGGTCTTGCAGCAGAA	GGGTCGTCTGTTGGATGATT	2214463	2214874	412	55.0	99.5%
cdiff_287	CD1919	putative ethanolamine/propanediol utilization cobalamin a...	GGCGCTAAAATTGGATGAAAA	GGCTGCAAGTCAACCTCTC	2220215	2220619	405	54.6	66.9%
cdiff_288	CD1938	biotin carboxylase (acetyl-CoA carboxylase subunit A)	CTTCTCTAGTTTCAGCCCAACA	AAGGAGTAGGTTATATCGGTGCAG	2235652	2236053	402	53.8	68.7%
cdiff_289	CD2033	arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	TGCGTCAGCTCCAAATACAG	GCAAAAGGTTCTGGCATGAT	2344926	2345345	420	54.5	99.0%
cdiff_290	CD2054	aspartokinase	GCACAAGTTATACGAATCTCTGATGT	AAGAGGGGGAAAGACATGAA	2367761	2368177	417	53.4	81.2%
cdiff_291	CD2077	dihydroorotate dehydrogenase, catalytic subunit	TTTCTCGCTTGATATGCACAA	GGGCAACCTTTATTAGGTGGA	2396256	2396668	413	53.5	63.5%
cdiff_292	CD3085	alpha-mannosidase	CTTCCTGTTGCCAAACTTCC	TGATGGAAAATGGAGGAGATG	3583667	3584068	402	52.4	67.5%
cdiff_293	CD3088	putative cellobiose-phosphate degrading protein	TGGCATGCTAATACATGAATCT	CGGTATTGTTACAAGTGCTGGA	3589077	3589494	418	54.4	87.9%
cdiff_294	CD3105	alcohol dehydrogenase	TCAAATGCTGTTGATGCAGT	GAGTAGAGCCAAACCAAAGTGT	3613459	3613861	403	54.3	66.0%
cdiff_295	CD3109	putative pentose-5-phosphate 3-epimerase	CCAAACTTTGTAGTCTTCATC	AGCAGCAGCAGGATGTAAC TT	3617506	3617964	459	54.8	63.6%
cdiff_296	CD3115	6-phospho-beta-glucosidase BglA	AATCAATTGTTCCCAACATC	TGAAAGTGAAGTGAAGACAAAAA	3627054	3627457	404	53.6	65.6%
cdiff_297	CD3130	putative 6-phospho-beta-glucosidase	TGCATGAGTTTCCATATCATT	ATGGCAAAACGACCTGTAG	3646301	3646712	412	53.6	60.9%
cdiff_298	CD3135	hypothetical aldolase	TGCCGACTTAACATCACTCG	TGATTGATGGCTCACATTTACC	3653848	3654263	416	54.5	66.4%

**Tab. A8:** *C. difficile* Stammsammlung zur Analyse der Mikroevolution des Ribotyps 027 – Teil I

Stamm	synonyme Bezeichnung	Herkunft	Jahr der Isolation	Fluorchinolon Empfindlichkeit <sup>a</sup>	Aminosäuresubstitution <sup>b</sup>		CDR20291_1775 <sup>c</sup>	<i>tcdC</i> <sup>d</sup>	CDT <sup>e</sup>
					GyrA	GyrB			
C1	08-00617, CD044	Montreal - Kanada	2005	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C2	08-00618, CD050	Montreal - Kanada	2005	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C3	08-00619, CD059	Montreal - Kanada	2005	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C4	08-00620, CD085	Toronto - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C5	08-00621, CD111	Toronto - Kanada	2007	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C6	08-00622, CD129	Toronto - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C7	08-00623, CD130	Toronto - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C8	08-00624, CD133	Toronto - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Asp-426-Asn	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C9	08-00625, CD138	Toronto - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C10	08-00626, CD144	Toronto - Kanada	2007	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C11	08-00627, CD145	Toronto - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Asp-426-Asn	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C12	08-00628, CD147	Toronto - Kanada	2007	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C13	08-00629, CD156	Sherbrooke - Kanada	2005	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C14	08-00630, CD166	Sherbrooke - Kanada	2005	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C15	08-00631, CD183	Sherbrooke - Kanada	2006	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C16	08-00632, CD184	Sherbrooke - Kanada	2006	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C17	08-00633, CD196	Sherbrooke - Kanada	2006	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C18	08-00634, CD205	Sherbrooke - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C19	08-00635, CD206	Sherbrooke - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
C20	08-00636, CD209	Sherbrooke - Kanada	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
J1	08-00581, DJNS 05-23	Gifu - Japan	2005	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
J2	08-00582, TMD 0138	Tokio - Japan	2001	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
CH1	08-00476, K1910	Basel - Schweiz	2006	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
CH2	08-00477, K2006	Basel - Schweiz	2006	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
CH3	K1710	Basel - Schweiz	2006	R	Thr-82-Ile	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
CH4	K769	Basel - Schweiz	2006	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D1	07-00080, JW608204	Stuttgart	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D2	07-00089, 9074979	Nordhorn	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D3	07-00090, 9074978	Nordhorn	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D4	08-00077, P5432	Trier	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D5	08-00093, N495	Trier	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB

<sup>a</sup> Interpretation der MHK-Werte nach EUCAST ([www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)); S = sensibel; R = resistent<sup>b</sup> Wt = Wildtyp; <sup>c</sup> PCR zum Nachweis des Markers CDR20291\_1775; <sup>d</sup> Del. = Deletion; <sup>e</sup> CDT = binäre Toxin



**Tab. A8:** *C. difficile* Stammsammlung zur Analyse der Mikroevolution des Ribotyps 027 – Teil II

Stamm	synonyme Bezeichnung	Herkunft	Jahr der Isolation	Fluorchinolon Empfindlichkeit <sup>a</sup>	Aminosäuresubstitution <sup>b</sup>		CDR20291_1775 <sup>c</sup>	<i>tcdC</i> <sup>d</sup>	CDT <sup>e</sup>
					GyrA	GyrB			
D6	08-00155	Mechernich	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D7	08-00201	Saarlouis	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D8	08-00233	Homburg/Saar	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D9	08-00263	Stuttgart	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D10	08-00267	Esslingen	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D11	08-00375	Essen	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D12	08-00411	Ludwigsburg	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D13	08-00462	Leipzig	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D14	08-00473, 77881-07	Freiburg	2007	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D15	08-00474, 77086-07	Freiburg	2007	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D16	08-00494	Halle/Saale	2008	R	Thr-82-Ile	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D17	08-00495	Esslingen	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D20	08-00669	Mühlheim	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D21	09-00060	Hamburg	1990	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
D22	09-00072	Hamburg	1990	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
S1	07-00025, T-378	Huddinge - Schweden	1997	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
S2	07-00026, Ö99-1670	Örebro - Schweden	1999	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
S3	07-00027, A177:1	Malmö - Schweden	2001	S	Wt	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
UK1	07-00001, NCTC13366, R20291	Stoke Mandeville - UK	2006	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA1	09-00181	Maine	2004	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA2	09-00182	Oklahoma	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA3	09-00183	Arizona	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA4	09-00184	New York	2009	R	Thr-82-Ile; Ala-118-Ser	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA5	09-00187	Maine	2008	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA6	09-00188	Ohio	2005	R	Thr-82-Ile	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA7	09-00189	Michigan	2006	R	Thr-82-Ile	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA8	09-00190	New Jersey	2004	R	Thr-82-Ile	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
USA9	09-00191	California	2006	R	Thr-82-Ile	Wt		Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB
<b>R</b>	08-00070, P5433	Trier	2007	R	Thr-82-Ile	Wt	positiv	Del.18bp+Pos.117	cdtA+cdtB

<sup>a</sup> Interpretation der MHK-Werte nach EUCAST ([www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)); S = sensibel; R = resistent

<sup>b</sup> Wt = Wildtyp; <sup>c</sup> PCR zum Nachweis des Markers CDR20291\_1775; <sup>d</sup> Del. = Deletion; <sup>e</sup> CDT = binäre Toxin

**Tab. A9: MLVA-Profil von 61 analysierten *C. difficile* Isolaten des Ribotyps 027.** Ein MLVA-Profil setzt sich aus den Kopiezahlen der sieben MLVA-Wiederholungssequenzen zusammen.

Stamm	MLVA-A6	MLVA-B7	MLVA-C6	MLVA-E7	MLVA-F3	MLVA-G8	MLVA-H9
C1	42	20	25	10	5	15	2
C2	37	15	23	10	5	15	2
C3	35	13	11	10	5	15	2
C4	40	20	43	9	5	15	2
C5	32	15	33	8	5	17	2
C6	40	23	23	10	5	15	2
C7	36	22	19	10	5	15	2
C8	30	20	42	10	5	16	2
C9	30	23	24	10	5	15	2
C10	16	14	42	9	5	12	2
C11	42	20	42	10	5	16	2
C12	31	14	30	9	5	14	2
C13	40	20	29	10	5	18	2
C14	40	20	30	10	5	18	2
C15	39	20	16	10	5	16	2
C16	41	21	30	10	5	16	2
C17	41	19	27	10	5	16	2
C18	46	22	30	10	5	17	2
C19	40	21	29	10	5	17	2
C20	47	21	30	10	5	17	2
CH1	29	11	55	8	5	14	2
CH2	21	16	22	8	5	14	2
CH3	18	11	31	9	5	13	2
CH4	39	19	37	10	5	16	2
D1	25	8	33	10	5	16	2
D2	24	8	26	10	5	16	2
D3	24	9	26	10	5	16	2
D4	25	8	26	10	5	16	2
D5	26	8	39	10	5	16	2
D6	25	8	32	10	5	16	2
D7	24	9	39	10	5	16	2
D8	27	8	29	10	5	13	2
D9	26	8	38	10	5	16	2
D10	25	8	29	10	5	16	2
D11	23	8	35	10	5	16	2
D12	26	8	33	10	5	17	2
D13	24	8	30	10	5	13	2
D14	28	15	34	9	5	15	2
D15	27	15	34	9	5	15	2
D16	20	14	42	9	5	14	2
D17	25	8	30	10	5	16	2
D20	23	9	35	10	5	16	2
D21	36	13	26	9	5	14	2
D22	36	13	26	9	5	14	2
J1	38	15	20	8	5	16	2
J2	19	14	31	9	5	9	2
R	25	8	26	10	5	16	2
S1	30	15	31	8	5	13	2
S2	28	11	44	9	5	9	2
S3	42	12	46	9	5	19	2
UK1	35	17	44	10	5	16	2
USA1	36	13	26	9	5	14	2
USA2	37	20	41	10	5	17	2
USA3	21	21	11	10	5	15	2
USA4	28	17	35	9	5	8	2
USA5	23	21	45	10	5	8	2
USA6	21	14	12	9	5	16	2
USA7	26	11	23	9	5	17	2
USA8	17	12	18	9	5	14	2
USA9	26	11	23	9	5	17	2
CD196	14	11	50	9	5	9	2

**Tab. A10:** Identifizierte Einzelnukleotidpolymorphismen in 22 Genomen des *C. difficile* Ribotyps 027 im Vergleich zum Referenzstamm CD196 – Teil I

Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP
2004013	6310	C	T	2004102	3458020	G	A	2004163	2917621	T	G	2007140	2828467	C	A
2004013	84306	G	A	2004102	3520152	G	T	2004163	3031309	A	C	2007140	2861888	G	A
2004013	118669	A	G	2004102	3817492	A	G	2004163	3194517	G	A	2007140	2917621	T	G
2004013	122678	G	T	2004102	3851505	A	C	2004163	3817492	A	G	2007140	3517577	A	C
2004013	459517	C	T	2004118	6310	C	T	2006439	6310	C	T	2007140	3538668	A	G
2004013	906741	C	T	2004118	84306	G	A	2006439	95520	G	A	2007140	3817492	A	G
2004013	1205250	G	C	2004118	118669	A	G	2006439	95650	A	G	2007218	122678	G	T
2004013	1235096	A	C	2004118	122678	G	T	2006439	122678	G	T	2007218	2917621	T	G
2004013	1462869	C	A	2004118	906741	C	T	2006439	882348	C	T	2007218	3817492	A	G
2004013	1549858	A	T	2004118	1205250	G	C	2006439	1029237	G	A	2007825	6310	C	T
2004013	1602810	C	G	2004118	1235096	A	C	2006439	1080078	C	T	2007825	118669	A	G
2004013	1602812	C	T	2004118	1462869	C	A	2006439	1205938	C	T	2007825	122678	G	T
2004013	1768249	C	T	2004118	1549858	A	T	2006439	1302078	C	A	2007825	351813	G	T
2004013	2219230	G	A	2004118	1602810	C	G	2006439	1798870	A	G	2007825	609787	C	T
2004013	2367860	G	A	2004118	1602812	C	T	2006439	2005709	A	C	2007825	716517	C	A
2004013	2568995	T	G	2004118	1796167	T	C	2006439	2114689	G	T	2007825	1205250	G	C
2004013	2851331	G	A	2004118	1799616	A	G	2006439	2487991	G	A	2007825	1235096	A	C
2004013	2917621	T	G	2004118	2219230	G	A	2006439	2722465	G	A	2007825	1462869	C	A
2004013	3031309	A	C	2004118	2367860	G	A	2006439	2861888	G	A	2007825	1549858	A	T
2004013	3817492	A	G	2004118	2568995	T	G	2006439	2917621	T	G	2007825	1602810	C	G
2004102	6310	C	T	2004118	2851331	G	A	2006439	3126346	G	T	2007825	1602812	C	T
2004102	95520	G	A	2004118	2917621	T	G	2006439	3168127	A	C	2007825	2094948	C	T
2004102	95650	A	G	2004118	3031309	A	C	2006439	3458020	G	A	2007825	2243965	A	G
2004102	122678	G	T	2004118	3817492	A	G	2006439	3520152	G	T	2007825	2367860	G	A
2004102	882348	C	T	2004163	6310	C	T	2006439	3817492	A	G	2007825	2568995	T	G
2004102	1029237	G	A	2004163	95280	G	T	2006439	3851505	A	C	2007825	2851331	G	A
2004102	1080078	C	T	2004163	118669	A	G	2007140	6310	C	T	2007825	2917621	T	G
2004102	1205938	C	T	2004163	122678	G	T	2007140	95510	C	A	2007825	3031309	A	C
2004102	1302078	C	A	2004163	1205250	G	C	2007140	95520	G	A	2007825	3817492	A	G
2004102	1798870	A	G	2004163	1235096	A	C	2007140	122678	G	T	2007837	6310	C	T
2004102	2005709	A	C	2004163	1462869	C	A	2007140	854270	G	T	2007837	118669	A	G
2004102	2114689	G	T	2004163	1549858	A	T	2007140	882348	C	T	2007837	122678	G	T
2004102	2487991	G	A	2004163	1602810	C	G	2007140	1029237	G	A	2007837	906741	C	T
2004102	2722465	G	A	2004163	1602812	C	T	2007140	1205938	C	T	2007837	1205250	G	C
2004102	2861888	G	A	2004163	2300319	G	T	2007140	1600744	T	G	2007837	1235096	A	C
2004102	2917621	T	G	2004163	2367860	G	A	2007140	1798870	A	G	2007837	1462869	C	A
2004102	3126346	G	T	2004163	2568995	T	G	2007140	2487991	G	A	2007837	1549858	A	T
2004102	3168127	A	C	2004163	2851331	G	A	2007140	2686494	A	G	2007837	1602810	C	G

**Tab. A10:** Identifizierte Einzelnukleotidpolymorphismen in 22 Genomen des *C. difficile* Ribotyps 027 im Vergleich zum Referenzstamm CD196 – Teil II

Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz-sequenz	SNP
2007837	1602812	C	T	bi13	2917621	T	G	bi3	551317	G	A	bi6	2861888	G	A
2007837	2283068	C	A	bi13	3126346	G	T	bi3	660153	A	G	bi6	2917621	T	G
2007837	2367860	G	A	bi13	3168127	A	C	bi3	766710	T	C	bi6	2957860	C	T
2007837	2568995	T	G	bi13	3392630	C	A	bi3	829779	G	A	bi6	3817492	A	G
2007837	2836689	G	A	bi13	3458020	G	A	bi3	877161	G	T	bi6	3992390	C	A
2007837	2851331	G	A	bi13	3520152	G	T	bi3	1088981	G	A	bi6p	6310	C	T
2007837	2917621	T	G	bi13	3817492	A	G	bi3	1314017	G	A	bi6p	118669	A	G
2007837	3031309	A	C	bi13	3851505	A	C	bi3	1490948	G	A	bi6p	122678	G	T
2007837	3411479	T	G	bi15	6310	C	T	bi3	1774439	T	C	bi6p	696367	C	T
2007837	3817492	A	G	bi15	23877	C	T	bi3	1777390	G	A	bi6p	778098	G	A
bi10	6310	C	T	bi15	95520	G	A	bi3	1848756	T	C	bi6p	854679	C	T
bi10	24996	G	A	bi15	95650	A	G	bi3	1890020	A	G	bi6p	1205250	G	C
bi10	95520	G	A	bi15	122678	G	T	bi3	2098189	T	C	bi6p	1235096	A	C
bi10	122678	G	T	bi15	229516	C	T	bi3	2132582	T	A	bi6p	1462869	C	A
bi10	882348	C	T	bi15	519946	C	A	bi3	2133563	A	G	bi6p	1549858	A	T
bi10	1029237	G	A	bi15	882348	C	T	bi3	2142853	G	A	bi6p	1602810	C	G
bi10	1205938	C	T	bi15	1029237	G	A	bi3	2370540	G	T	bi6p	1602812	C	T
bi10	1798870	A	G	bi15	1205938	C	T	bi3	2917621	T	G	bi6p	1799724	C	T
bi10	2487991	G	A	bi15	1270935	C	T	bi3	2970844	G	T	bi6p	2367860	G	A
bi10	2861888	G	A	bi15	1419491	G	A	bi3	2990977	T	C	bi6p	2421724	G	T
bi10	2917621	T	G	bi15	1798870	A	G	bi3	3232705	C	A	bi6p	2568995	T	G
bi10	3817492	A	G	bi15	2114689	G	T	bi3	3607336	A	G	bi6p	2851331	G	A
bi10	3851505	A	C	bi15	2487991	G	A	bi3	3634260	G	T	bi6p	2917621	T	G
bi13	6310	C	T	bi15	2722465	G	A	bi3	3771166	A	G	bi6p	3031309	A	C
bi13	95520	G	A	bi15	2861888	G	A	bi3	3802854	G	C	bi6p	3416932	G	T
bi13	95650	A	G	bi15	2917621	T	G	bi3	3817492	A	G	bi6p	3817492	A	G
bi13	122678	G	T	bi15	3126346	G	T	bi3	4061552	G	A	bi6p	3916246	A	C
bi13	882348	C	T	bi15	3168127	A	C	bi3	4072452	G	A	bi7	6310	C	T
bi13	1029237	G	A	bi15	3520152	G	T	bi5	122678	G	T	bi7	122678	G	T
bi13	1080078	C	T	bi15	3817492	A	G	bi5	2917621	T	G	bi7	719728	T	G
bi13	1205938	C	T	bi15	3851505	A	C	bi5	3817492	A	G	bi7	737702	C	T
bi13	1302078	C	A	bi2	122678	G	T	bi6	6310	C	T	bi7	1029237	G	A
bi13	1798870	A	G	bi2	2917621	T	G	bi6	122678	G	T	bi7	1205938	C	T
bi13	2005709	A	C	bi2	3817492	A	G	bi6	585584	A	G	bi7	1367732	C	T
bi13	2114689	G	T	bi3	122678	G	T	bi6	1029237	G	A	bi7	2487991	G	A
bi13	2487991	G	A	bi3	275780	G	A	bi6	1205938	C	T	bi7	2861888	G	A
bi13	2722465	G	A	bi3	433029	C	T	bi6	1367732	C	T	bi7	2917621	T	G
bi13	2861888	G	A	bi3	485842	A	G	bi6	2487991	G	A	bi7	3817492	A	G

**Tab. A10:** Identifizierte Einzelnukleotidpolymorphismen in 22 Genomen des *C. difficile* Ribotyps 027 im Vergleich zum Referenzstamm CD196 – Teil III

Stamm	Position (CD196)	Referenz- sequenz	SNP	Stamm	Position (CD196)	Referenz- sequenz	SNP
bi7	3851505	A	C	R20291	2079714	G	T
bi7	3992390	C	A	R20291	2217107	C	T
2007855	6310	C	T	R20291	2281394	A	C
2007855	95520	G	A	R20291	2367860	G	A
2007855	95650	A	G	R20291	2568995	T	G
2007855	122678	G	T	R20291	2851331	G	A
2007855	882348	C	T	R20291	2896206	A	G
2007855	1029237	G	A	R20291	2917621	T	G
2007855	1080078	C	T	R20291	3031309	A	C
2007855	1205938	C	T	R20291	3450852	T	C
2007855	1302078	C	A	R20291	3635024	C	T
2007855	1798870	A	G	R20291	3817492	A	G
2007855	1878843	T	G	R20291	4067114	G	A
2007855	2005709	A	C	bi1	122678	G	T
2007855	2114689	G	T	bi1	793482	C	T
2007855	2487991	G	A	bi1	793487	G	A
2007855	2722465	G	A	bi1	2176348	T	C
2007855	2861888	G	A	bi1	2886202	C	T
2007855	2917621	T	G	bi1	2917621	T	G
2007855	3047950	A	G	bi1	3634533	C	A
2007855	3083454	G	A	D22	122678	G	T
2007855	3126346	G	T	D22	304927	C	T
2007855	3168127	A	C	D22	572007	C	T
2007855	3458020	G	A	D22	1523138	A	T
2007855	3520152	G	T	D22	2800854	G	T
2007855	3817492	A	G	D22	2917621	T	G
R20291	6310	C	T	D22	2942162	G	A
R20291	30690	C	A	D22	3047950	A	G
R20291	118669	A	G	D22	3817492	A	G
R20291	121030	A	C				
R20291	122678	G	T				
R20291	906741	C	T				
R20291	1119249	T	G				
R20291	1205250	G	C				
R20291	1235096	A	C				
R20291	1462869	C	A				
R20291	1549858	A	T				
R20291	1880630	C	A				

**Tab. A11:** Charakteristika der Einzelnukleotidpolymorphismen der *C. difficile* Stämme D22 und R20291 im Vergleich zum Referenzstamm CD196

Stamm	Position (CD196)	Referenz- sequenz	SNP	Kategorie	Aminosäure Substitution	ORF	Annotation
D22	122678	G	T	synonym		CD196_0110	ABC TransporterZ, ATP-binding protein
D22	304927	C	T	nicht-synonym	H→Y	CD196_0256	glycosyl transferase, group 2 family
D22	572007	C	T	nicht-synonym	Q→Stopp	CD196_0487	putative penicillin-binding protein repressor
D22	1523138	A	T	nicht-synonym	D→V	CD196_1304	putative ribonuclease
D22	2800854	G	T	nicht-synonym	P→Q	CD196_2409	two-component sensor histidine kinase
D22	2917621	T	G	intergenetisch			Intergenic
D22	2942162	G	A	nicht-synonym	A→V	CD196_2530	putative lipoprotein
D22	3047950	A	G	synonym		CD196_2610	capsular polysaccharide biosynthesis protein
D22	3817492	A	G	synonym		CD196_3217	putative aminotransferase
R20291	6310	C	T	nicht-synonym	T→I	CD196_0006	GyrA
R20291	30690	C	A	intergenetisch			intergenic
R20291	118669	A	G	nicht-synonym	N→D	CD196_0102	putative ribosomal protein
R20291	121030	A	C	synonym		CD196_0108	DNA-directed RNA-Pol alpha chain
R20291	122678	G	T	synonym		CD196_0110	ABC transporter, ATP-binding protein
R20291	906741	C	T	nicht-synonym	P→S	CD196_0754	electron transfer flavoprotein beta subunit
R20291	1119249	T	G	synonym		CD196_0922	putative membran protein
R20291	1205250	G	C	nicht-synonym	V→L	CD196_1007	putative penicillin-binding protein
R20291	1235096	A	C	nicht-synonym	N→T	CD196_1035	putative protein
R20291	1462869	C	A	nicht-synonym	A→D	CD196_1253	probable transporter
R20291	1549858	A	T	nicht-synonym	L→I	CD196_1331	putative 5-nitroimidazole reductase
R20291	1880630	C	A	nicht-synonym	G→V	CD196_1618	putative arsenical pump membran protein
R20291	2079714	G	T	nicht-synonym	A→S	CD196_1803	putative peptidase
R20291	2217107	C	T	nicht-synonym	G→E	CD196_1925	putative protein
R20291	2281394	A	C	intergenetisch			intergenic
R20291	2367860	G	A	nicht-synonym	A→V	CD196_2045	ATP-dependent RNA helicase
R20291	2568995	T	G	nicht-synonym	I→L	CD196_2213	quinolinate synthetase A
R20291	2851331	G	A	nicht-synonym	L→F	CD196_2452	hypothetical protein
R20291	2896206	A	G	nicht-synonym	I→T	CD196_2494	UDP N-acetylmuramoylalanine D-glutamate ligase
R20291	2917621	T	G	intergenetisch			intergenic
R20291	3031309	A	C	synonym		CD196_2596	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
R20291	3450852	T	C	nicht-synonym	I→V	CD196_2922	PTS system, IIabc component
R20291	3635024	C	T	intergenetisch			intergenic
R20291	3817492	A	G	synonym		CD196_3217	putative aminotransferase
R20291	4067114	G	A	synonym		CD196_3451	hypothetical protein

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Ampere	<b>g</b>	Gramm
<b>Abb.</b>	Abbildung		Erdbeschleunigung
<b>ABC</b>	ATP-bindende Kassette; engl. <i>ATP-binding cassette</i>	<b>GTP</b>	Guanosin-5'-triphosphat
<b>Aqua bidest.</b>	zweifach destilliertes Wasser	<b>GTPase</b>	Guanosintriphosphatase
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>	<b>h</b>	Stunde
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat	<b>k-</b>	kilo (1 x 10 <sup>3</sup> )
<b>bp</b>	Basenpaare; engl. <i>base pairs</i>	<b>KBE</b>	Koloniebildende Einheit
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<b>KI</b>	Konfidenzintervall
<b>C.</b>	Clostridium	<b>l</b>	Liter
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>M</b>	molar (mol/l)
<b>CCFA</b>	Cycloserin-Cephoxitin-Fructose-Agar	<b>m-</b>	milli- (1 x 10 <sup>-3</sup> )
<b>CDI</b>	<i>Clostridium difficile</i> Infektion	<b>-m</b>	Meter
<b>CDAB</b>	Clostridium-Difficile-Agar-Basis	<b>Mb</b>	Megabasenpaare (1 x 10 <sup>6</sup> )
<b>CDT</b>	<i>Clostridium difficile</i> ADP-Ribosyltransferase kodierender Bereich für die enzymatische (A) und Bindedomäne (B) der ADP-Ribosyltransferase	<b>MDR</b>	engl. <i>multidrug resistance</i>
<b>cdtA/B</b>		<b>MHK</b>	minimale Hemmkonzentration
<b>dATP</b>	2'-Desoxyriboadenosin-5'-triphosphat	<b>min</b>	Minuten
<b>dCTP</b>	2'-Desoxyribocytidin-5'-triphosphat	<b>MLST</b>	Multilokus-Sequenz-Typisierung
<b>ddNTP</b>	2', 3'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	<b>MLVA</b>	<i>Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis</i>
<b>dGTP</b>	2'-Desoxyriboguanosin-5'-triphosphat	<b>MRSA</b>	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>dHPLC</b>	denaturierende Hochdruckflüssigkeits- chromatographie; engl. <i>denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>	<b>MST</b>	<i>Minimum Spanning Tree</i>
<b>DI</b>	Diskriminatorische Index	<b>μ-</b>	mikro- (1 x 10 <sup>-6</sup> )
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure; engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>	<b>n-</b>	nano (1 x 10 <sup>-9</sup> )
<b>dNTP</b>	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	<b>NCTC</b>	<i>National Collection of Type Cultures</i>
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	<b>OD</b>	optische Dichte
<b>dTTP</b>	2'-Desoxyribothymidin-5'-triphosphat	<b>ORF</b>	offenes Leseraster; engl. <i>open reading frame</i>
<b>E</b>	Extinktion	<b>ori</b>	Replikationsursprung; engl. <i>origin of replication</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>PaLoc</b>	Pathogenitätslokus von <i>Clostridium difficile</i>
<b>engl.</b>	englisch	<b>PAUP</b>	<i>Phylogenetic Analysis using Parsimony</i>
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> (und andere)	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion; engl. <i>polymerase chain reaction</i>
<b>ε</b>	molarer Extinktionskoeffizient	<b>pH</b>	<i>potentium hydrogenii</i>
		<b>PMC</b>	Pseudomembranöse Kolitis; engl. <i>Pseudomembranous Colitis</i>

<b><math>\Omega</math></b>	Ohm (elektrischer Widerstand)	<b>TcdC</b>	negativer Toxinregulator von Toxin A und B
<b>QRDR</b>	<i>Quinolone Resistance-determining Region</i>	<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure; engl. <i>ribonucleic acid</i>	<b>TEAA</b>	Triethylammoniumacetat
<b>rpm</b>	Rotationen pro Minute	<b>Tm</b>	Schmelztemperatur
<b>s.</b>	siehe	<b>TR</b>	Wiederholungssequenz, engl. <i>tandem repeat</i>
<b>sec</b>	Sekunde	<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>SNP</b>	Einzelnukleotidpolymorphismus; engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>	<b>tRNA</b>	Transfer-RNA
<b>ST</b>	MLST-Sequenztyp	<b>TRST</b>	Tandem-Repeat-Sequenz-Typisierung
<b>STRD</b>	<i>Summed Tandem Repeat Difference</i>	<b>U</b>	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
<b>Tab.</b>	Tabelle	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA	<b>V</b>	Volt (elektrische Spannung)
<b>Taq</b>	<i>Thermus Aquaticus</i>	<b>W</b>	Watt (elektrische Leistung)
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA	<b>Wt</b>	Wildtyp
<b>TcdA</b>	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A		
<b>TcdB</b>	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B		

## Symbole für den Nukleinsäurecode

<b>A</b>	Desoxyadenosin
<b>C</b>	Desoxycytidin
<b>G</b>	Desoxyguanosin
<b>T</b>	Desoxythymidin

## Symbole für die Aminosäuren

<b>Alanin</b>	Ala	A	<b>Leucin</b>	Leu	L
<b>Arginin</b>	Arg	R	<b>Lysin</b>	Lys	K
<b>Asparagin</b>	Asn	N	<b>Methionin</b>	Met	M
<b>Asparaginsäure</b>	Asp	D	<b>Phenylalanin</b>	Phe	F
<b>Cystein</b>	Cys	C	<b>Prolin</b>	Pro	P
<b>Glutamin</b>	Gln	Q	<b>Serin</b>	Ser	S
<b>Glutaminsäure</b>	Glu	E	<b>Threonin</b>	Thr	T
<b>Glycin</b>	Gly	G	<b>Tryptophan</b>	Trp	W
<b>Histidin</b>	His	H	<b>Tyrosin</b>	Tyr	Y
<b>Isoleucin</b>	Ile	I	<b>Valin</b>	Val	V



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>C. difficile</i> .....	3
<b>Abb. 1.2:</b> Pathogenese von <i>C. difficile</i> .....	5
<b>Abb. 1.3:</b> Histopathologischer Befund einer Pseudomembranösen Kolitis .....	7
<b>Abb. 1.4:</b> Anzahl der Erkrankungen an Enterokolitis durch <i>C. difficile</i> (ICD-10-Diagnose A04.7) bei vollstationären Patienten in Deutschland nach Jahr .....	8
<b>Abb. 3.1:</b> Nachweis der binären und großen clostridialen Toxingene mittels PCR .....	41
<b>Abb. 3.2:</b> Prävalenz der fünf häufigsten <i>C. difficile</i> PCR-Ribotypen aus schweren Infektionsverläufen in deutschen Krankenhäusern, 2008 .....	43
<b>Abb. 3.3:</b> Geographische Ausbreitung der <i>C. difficile</i> PCR-Ribotypen 001, 078 und 027 in deutschen Krankenhäusern, 2008 .....	44
<b>Abb. 3.4:</b> Duplex-PCR zur simultanen Amplifizierung der Regionen TR6 und TR10 aus <i>C. difficile</i> Isolaten unterschiedlicher Ribotypen .....	50
<b>Abb. 3.5:</b> Schematische Darstellung der Tandem Repeat Sequenztypisierung - TRST .....	51
<b>Abb. 3.6:</b> Phylogenetische Analyse ( <i>Neighbor Joining</i> ) basierend auf der Abfolge der Wiederholungsmotive konkatenierter TR6 und TR10 Sequenzen von 154 <i>C. difficile</i> Isolaten .....	53
<b>Abb. 3.7:</b> Clusteranalyse (UPGMA) basierend auf den MLST-Allelprofilen von 43 <i>C. difficile</i> Isolaten .....	55
<b>Abb. 3.8:</b> Bandenmuster der PCR-Ribotypisierung in der Agarosegelelektrophorese .....	56
<b>Abb. 3.9:</b> <i>Minimum Spanning</i> Dendrogramm basierend auf den MLVA-Profilen von 61 <i>C. difficile</i> Ribotyp 027 Isolaten .....	62
<b>Abb. 3.10:</b> Verteilung der Allele einzelner MLVA-Wiederholungsregionen im <i>Minimum Spanning</i> Dendrogramm .....	65
<b>Abb. 3.11:</b> Annotation chromosomaler DNA des <i>C. difficile</i> Stammes D22 mit Hilfe des RAST-Servers .....	68
<b>Abb. 3.12:</b> Genkarte des Prophagen $\Phi$ BI-1 .....	70
<b>Abb. 3.13:</b> <i>Maximum Likelihood</i> Phylogramm basierend auf 132 SNPs im Kerngenom von 23 internationalen <i>C. difficile</i> Stämmen des Ribotyps 027 .....	72
<b>Abb. 4. 1:</b> Entwicklung der effektiven Populationsgröße des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027 über die Zeit .....	93

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1:</b> Zusammenstellung bisher identifizierter Virulenzfaktoren von <i>C. difficile</i> .....	6
<b>Tab. 2.1:</b> Zusammenstellung der verwendeten Instrumente mit Hersteller .....	17
<b>Tab. 2.2:</b> Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Kits mit Hersteller .....	18
<b>Tab. 2.3:</b> Zusammenstellung der verwendeten Software mit Hersteller .....	21
<b>Tab. 2.4:</b> Zusammenstellung der von der NCTC und DSMZ bezogenen <i>C. difficile</i> Stämme .....	22
<b>Tab. 2.5:</b> Für die PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung verwendete Oligonukleotid-Primer .....	27
<b>Tab. 2.6:</b> Für die PCR-Ribotypisierung verwendete Oligonukleotid-Primer .....	31
<b>Tab. 2.7:</b> In der MLST zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Gene verwendete Oligonukleotid-Primer .....	32
<b>Tab. 2.8:</b> In der MLVA zur PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Wiederholungssequenzen verwendete Oligonukleotid-Primer .....	34
<b>Tab. 2.9:</b> Für die Duplex-PCR der TRST verwendete Oligonukleotid-Primer .....	35
<b>Tab. 2.10:</b> MHK-Grenzwerte für Metronidazol, Vancomycin, Levofloxacin und Moxifloxacin nach EUCAST* .....	39
<b>Tab. 3.1:</b> Resistenzbestimmung des <i>C. difficile</i> Stammes JW608204 gegenüber ausgewählten Antibiotika .....	42
<b>Tab. 3.2:</b> MHK-Mittelwerte der sieben häufigsten <i>C. difficile</i> PCR-Ribotypen für die Therapie-antibiotika Metronidazol und Vancomycin .....	45
<b>Tab. 3.3:</b> Fluorchinolonresistenz und assoziierte DNA-Gyrase Mutationen innerhalb der fünf prävalentesten <i>C. difficile</i> PCR-Ribotypen in Deutschland, 2008 .....	46
<b>Tab. 3.4:</b> Charakteristika der Wiederholungssequenzen TR6 und TR10 .....	48
<b>Tab. 3.5:</b> Diskriminierungsvermögen und Konkordanz der Tandem Repeat Sequenztypisierung und PCR-Ribotypisierung .....	49
<b>Tab. 3.6:</b> Übersicht über die Sequenzierung und Annotation chromosomaler DNA des <i>C. difficile</i> Stammes D22 .....	68
<b>Tab. 3.7:</b> Übersicht der sequenzierten <i>C. difficile</i> Stämme des Ribotyps 027 .....	69
<b>Tab. A1:</b> Diversität von <i>C. difficile</i> aus schweren Infektionsverläufen in Deutschland, 2008 .....	XXII
<b>Tab. A2:</b> Wiederholungssequenzen im Genom des <i>C. difficile</i> Stammes 630 .....	XXIII
<b>Tab. A3:</b> Identifizierte TRST-Sequenztypen mit jeweiliger Abfolge der Wiederholungsmotive der Regionen TR6 und TR10 .....	XXIV
<b>Tab. A4:</b> DNA-Sequenzen identifizierter Wiederholungsmotive der TRST-Region TR6 .....	XXVIII
<b>Tab. A5:</b> DNA-Sequenzen identifizierter Wiederholungsmotive der TRST-Region TR10 .....	XXIX
<b>Tab. A6:</b> <i>C. difficile</i> Stammsammlung zur Evaluierung der Tandem Repeat Sequenz Typisierung .....	XXX
<b>Tab. A7:</b> Übersicht der anhand des <i>C. difficile</i> Stammes 630 ausgewählten genetischen Regionen für die SNP-Analyse .....	XXXIII
<b>Tab. A8:</b> <i>C. difficile</i> Stammsammlung zur Analyse der Mikroevolution des Ribotyps 027 .....	XLII
<b>Tab. A9:</b> MLVA-Profil von 61 analysierten <i>C. difficile</i> Isolaten des Ribotyps 027 .....	XLIV
<b>Tab. A10:</b> Identifizierte Einzelnukleotidpolymorphismen in 22 Genomen des <i>C. difficile</i> Ribotyps 027 im Vergleich zum Referenzstamm CD196 .....	XLV
<b>Tab. A11:</b> Charakteristika der Einzelnukleotidpolymorphismen der <i>C. difficile</i> Stämme D22 und R20291 im Vergleich zum Referenzstamm CD196 .....	XLVIII

## Danksagung

And dieser Stelle möchte ich all denen danken, die Anteil an der Anfertigung der Dissertation hatten:

Insbesondere Herrn Professor Dr. Wolfgang Witte, Institutsleiter der Außenstelle des Robert Koch-Instituts in Wernigerode und Leiter des Fachgebiets 13 „Nosokomiale Infektionen“ für die Möglichkeit und das entgegengebrachte Vertrauen, diese Arbeit am Institut anfertigen zu dürfen, sowie für die exzellente Förderung und Betreuung während des gesamten Promotionsprozesses.

Herrn Professor Dr. Dieter Jahn, Geschäftsführender Leiter des Instituts für Mikrobiologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, für die Bereiterklärung dieses Promotionsverfahren als Mentor zu begleiten, wodurch der Abschluss der Promotion an der TU Braunschweig erst ermöglicht wurde.

Herrn PD Dr. Max Schobert, Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig, für die Bereitschaft als Fachprüfer der Promotionskommission beizusitzen und den Vorsitz der Kommission zu übernehmen.

Herrn Dr. Ulrich Nübel, Robert Koch-Institut Wernigerode, für die hervorragende Betreuung mit all den hilfreichen Diskussionen und Vorschlägen, ohne die die Bearbeitung des Themas nicht möglich gewesen wäre.

Heike Illiger für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor, sowie Ihren Humor, welcher den Laboralltag erheitert hat.

Janina Dordel für all die Unterstützung und Hilfe bei Softwareanwendung und bioinformatischen Problemen.

Dem Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts in Berlin, insbesondere Julia Tesch und Piotr Wojtek Dabrowski, für die zuverlässige und schnelle Bearbeitung der Sequenzierproben und Bereitstellung hochwertiger Sequenzdaten.

Allen Einsender von *Clostridium difficile* Isolaten, insbesondere Herrn Professor Dr. Ed Kuijper und Celine Harmanus vom niederländischen Referenzlabor für *C. difficile* am LUMC (Leiden University Medical Centre) in Leiden, Herrn Professor Dr. Manfred Kist dem Leiter des deutschen Konsiliarlabor für gastrointestinale Infektionen in Freiburg, Frau PD Dr. Grit Ackermann von der Medizinischen Kooperationsgemeinschaft für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie in Leipzig, Frau Professor Dr. Maja Rupnik vom Institute of Public Health der Universität Maribor, Slowenien und Herrn Dr. Jan Weile vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart für den Austausch wichtiger Stämme sowie deren Unterstützung bei der Etablierung der PCR-Ribotypisierung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachgebiets 13 am Robert Koch-Institut für das nette Arbeitsklima, insbesondere Annette Weller und Christa Cuny für die vielen Ratschläge bei Fragen im Labor.

Allen Doktoranden am RKI in Wernigerode für die Zerstreuung vom wissenschaftlichen Alltag, insbesondere Angela Cullik (ohne deren energetische Versorgung ich längst verstorben wäre), Jenny Laverde Gomez (dank der ich jetzt fließend spanisch spreche), Melanie Zischka (dank der meine Büropflanzen vom Selbstmord abgesehen haben) und Janina Dordel (die mich für Excel-Tabellen mit mehr als 60.000 Zeilen begeistern konnte).

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Verlobten Anne Gutsche bedanken, die ich über alles Liebe, sowie bei meinen Eltern und Geschwistern, die mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Explizit nicht danken möchte ich Willy Drube, dem damaligen Inhaber der Apotheke „Zum Roten Fingerhut“, der 1924 die Rezeptur des Schierker Feuersteins entwickelt und für die schlimmsten Kopfschmerzen meines Lebens gesorgt hat.

## Lebenslauf